

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sunčana Sikirić

**UČINAK EKSTRAKTA LISTA OBIČNE PLANIKE (*ARBUTUS
UNEDO L.*), ARBUTINA I HIDROKINONA NA
HEMATOLOŠKE I BIOKEMIJSKE PARAMETRE KRVU U
ŠTAKORA SOJA LEWIS**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sunčana Sikirić

**UČINAK EKSTRAKTA LISTA OBIČNE PLANIKE (*ARBUTUS
UNEDO* L.), ARBUTINA I HIDROKINONA NA
HEMATOLOŠKE I BIOKEMIJSKE PARAMETRE KRVU U
ŠTAKORA SOJA LEWIS**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Benković, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Veliko hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Vesni Benković, na savjetima, razumijevanju i iznimnom strpljenju te predanosti prema ovom radu.

Zahvaljujem svim suradnicima i zaposlenicima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na podršci i nesebičnoj i stručnoj pomoći te doprinosu za izradu ovog rada.

Hvala mojoj obitelji, koja mi je pružala motivaciju i oslonac tijekom cijelog studija, Giti, Dunji i Želji pogotovo.

Hvala i svim mojim prijateljicama i prijateljima, kolegama i kolegicama s fakulteta koji su samnom bili i pomagali mi na svakom koraku.

Pogotovo hvala Ani Korši, na svemu.

Ovaj rad posvećujem svojoj dragoj mami.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINAK EKSTRAKTA LISTA OBIČNE PLANIKE (*ARBUTUS UNEDO L.*), ARBUTINA I HIDROKINONA NA HEMATOLOŠKE I BIOKEMIJSKE PARAMETRE KRVI U ŠTAKORA SOJA LEWIS

Sunčana Sikirić
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Obična planika je zimzelena biljka široko rasprostranjena u mediteranskom podneblju. Ona sadrži različite bioaktivne sastojke među kojima su i polifenoli. Zahvaljujući njima obična planika ima mnoga blagotvorna svojstva. Najzastupljeniji od polifenola je arbutin koji se u narodnoj medicini često koristi kao lijek za različite tegobe kao što su zubobolje, urinarne infekcije ili nadutost. Biološki učinci arbutina dolaze od njegovog metabolita hidrokinona. Ovo istraživanje provedeno je s ciljem procjene učinka ekstrakta lista obične planike, arbutina i hidrokinona na životinjskom modelu. Muški i ženski štakori soja Lewis, starosti oko 60 dana, slučajnim odabirom raspodijeljeni su u pokusne skupine od po 4 životinje oba spola. Štakori su tretirani oralno gastralnom kanilom tijekom 14 i 28 dana vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg), arbutinom (200 mg/kg) ili hidrokinonom (200 mg/kg). Analiza hematoloških i biokemijskih parametara krvi štakora vršena je nakon 14 odnosno 28 dana trajanja tretmana. Krv je sakupljena punkcijom aorte i prebačena u heparizirane vakuteine te su u njoj analizirani hematološki parametri dok su iz seruma tretiranih životinja određeni biokemijski parametri krvi. Arbutin i ekstrakt lista obične planike primjenjivani tijekom 14 dana pokazali su statistički značajno ($p < 0,05$, t-test) smanjenje broja bijelih krvnih stanica, u odnosu na kontrolnu skupinu. Ekstrakt lista obične planike pokazuje statistički značajno ($p < 0,05$, Scheffe test) povećanje broja bijelih krvnih stanica nakon 28 dana tretmana u odnosu na tretman tijekom 14 dana. Rezultati analize ostalih hematoloških i biokemijskih parametara ukazuju da ispitivane tvari u promjenjivanim dozama nemaju štetne učinke na štakorima soja Lewis.

(52 stranice, 17 slika, 20 tablica, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: obična planika, arbutin, hidrokinon, hematološki parametri, biokemijski parametri krvi

Voditelj: dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor

Ocjenitelji: dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor

dr. sc. Perica Mustafić

dr. sc. Zlatko Liber

Rad prihvaćen: 16.2.2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

THE EFFECT OF WILD STRAWBERRY TREE (*ARBUTUS UNEDO* L.) LEAF EXTRACT, ARBUTIN AND HYDROQUINONE ON HAEMATOLOGY AND BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS

Sunčana Sikirić
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Strawberry tree is an evergreen plant widely spread in the Mediterranean climate. This plant contains different bioactive chemicals, polyphenols among others. The most common of the polyphenols is arbutin, often used in folk medicine as a remedy for toothaches, urinary infections and bloating. The beneficial effects of arbutin come from its metabolite hydroquinone. This research was carried out with the aim of evaluating the effect of strawberry tree leaf extract, arbutin and hydroquinone on an animal model. Rats of the Lewis breed, approximately 60 days old, were separated into groups of 4 animals of both gender and treated with strawberry tree leaf extract (200 mg/kg), arbutin (200 mg/kg) or hydroquinone (200 mg/kg) during 14 and 28 days. The haematological and biochemistry parameters of blood were analysed after 14 and 28 days of treatment. The blood was collected from the aorta into heparinised vacutainers and used for haematology and serum for biochemical parameters analysis. After 14 days of treatment with arbutin and strawberry tree leaf extract a statistically significant ($p < 0.05$, t-test) decrease in the white blood cell count was observed when compared to the control. The strawberry tree leaf extract treatment during 28 days showed a statistically significant ($p < 0.05$, Scheffe test) increase in the white blood cell count as compared to the 14 day treatment.. The results of other haematological and biochemistry parameters showed that the substances we tested have no toxic effect on the Lewis rat.

(52 pages, 17 figures, 20 tables, 43 references, original in Croatian)
Thesis deposited in the Central biological library

Keywords: strawberry tree, arbutin, hydroquinone, haematology, blood biochemical parameters

Supervisor: Dr. Vesna Benković, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Vesna Benković, Assoc. Prof.

dr. sc. Perica Mustafić

dr. sc. Zlatko Liber

Thesis accepted: 16.2.2017

POPIS KRATICA:

ALP – alkalna fosfataza

ALT – alanin aminotransferaza

AML – akutna mieloična leukemija

AST – aspartat aminotransferaza

GRA – skupina bijelih krvnih stanica u koju spadaju granulociti

Hct – hematokrit

Hb – hemoglobin

LD₅₀ – (engl. lethal dose) letalna doza za 50% populacije

LHD – laktat dehidrogenaza

LYM – skupina bijelih krvnih stanica u koju spadaju limfociti

MCH – (engl. mean corpuscular hemoglobin) srednja količina hemoglobina u eritrocitu

MCHC – (engl. mean corpuscular hemoglobin concentration) srednja stanična vrijednost hemoglobina

MCV – (engl. mean corpuscular volume) srednji stanični volumen

MID – skupina bijelih krvnih stanica u koju spadaju monociti i eozinofili

MPV – (engl. mean platelet volume) srednji volumen trombocita

NHL – non-Hodkinov limfom

OECD – (engl. Organisation for Economic Co-operation and Development) organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj

PCT – (engl. plateletcrit) trombokrit

PDW – (engl. platelet distribution width) indeks heterogenosti populacije eritrocita

PLT – (engl. platelet) broj trombocita

RBC – (engl. red blood cell count) broj eritrocita

RDW – (engl. red blood cell distribution width) indeks heterogenosti populacije eritrocita

ROS – (engl. reactive oxygen species) reaktivne kisikove vrste

US EPA – (engl. United States Environmental Protection Agency) agencija za zaštitu okoliša Sjedinjenih Američkih Država

WBC – (engl. white blood cell count) broj leukocita

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Obična planika	1
1.2. Kemijski sastav obične planike	2
1.3. Polifenoli i flavonoidi	3
1.4. Oksidativni stres	4
1.5. Arbutin	5
1.6. Hidrokinon	6
1.7. Sastav krvi	8
1.8. Hematološki parametri u krvi	8
1.8.1. Broj eritrocita	8
1.8.2. Volumen i udio crvenih krvnih stanica u krvi	8
1.8.3. Hemoglobin	9
1.8.4. Srednji stanični volumen i indeks heterogenosti populacije eritrocita	9
1.8.5. Srednja stanična vrijednost hemoglobina i srednja količina hemoglobina u eritrocitu	9
1.8.6. Broj leukocita	10
1.8.7. Broj trombocita	10
1.9. Biokemijski parametri krvi	11
1.9.1. Aspartat i alanin aminotransferaza	11
1.9.2. Laktat dehidrogenaza	12
1.9.3. Ukupni proteini	12
1.9.4. Kreatinin	12
1.9.5. Glukoza	13
1.9.6. Urea	13
1.10. Cilj istraživanja	14
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1. Priprema otopina	15
2.2. Pokusne životinje	15
2.3. Tretman životinja	15
2.4. Analiza hematoloških i biokemijskih parametara u uzorcima krvi	16
2.5. Statistička obrada podataka	16
3. REZULTATI	17
3.1. Hematološki parametri	17

3.1.1. Analiza broja eritrocita i indeksa heterogenosti populacije eritrocita	17
3.1.2. Analiza broja trombocita i vezanih parametara	20
3.1.3. Analiza hematokrita	24
3.1.4. Analiza hemoglobina i izvedenih parametara	26
3.1.5. Analiza broja bijelih krvnih stanica	29
3.1.6. Analiza pojedinih tipova bijelih krvnih stanica	31
3.2. Biokemijski parametri	33
3.2.1. Analiza enzima aspartat aminotransferaze	33
3.2.2. Analiza alanin aminotransferaze	34
3.2.3. Analiza laktat dehidrogenaze	36
3.2.4. Analiza kreatinina	37
3.2.5. Analiza glukoze	38
3.2.6. Analiza uree	40
3.2.7. Analiza ukupnih proteina	41
4. RASPRAVA	43
5. ZAKLJUČAK	46
Literatura	47
Životopis	51

1. UVOD

Obična planika je biljka koja u Europi raste na području Mediterana, a u Hrvatskoj duž Jadranske obale (1). Njezin je plod boba, žuto-crvene boje, koja pri konzumaciji u većoj količini izaziva probavne smetnje i omaglicu kod ljudi, ali se ipak često koristi u narodnoj medicini kao lijek za različite tegobe kao što su zubobolje, urinarne infekcije ili nadutost (1). U mnogim je istraživanjima zaključeno da obična planika djeluje povoljno na ljudsko zdravlje zbog toga što sadrži mnoge bioaktivne tvari među kojima i različiti polifenoli (2,4). Jedan od najbitnijih polifenolnih spojeva, koje obična planika sadrži, jest arbutin (2). Arbutin ima antimikrobna svojstva i često se koristi kao antiseptik pri urinarnim infekcijama. Ipak, tijekom metaboliziranja arbutina nastaje hidrokinon, tvar koja je u dosadašnjim istraživanjima pokazala genotoksično djelovanje te se nameće pitanje u kojim je dozama arbutin siguran za upotrebu (3).

1.1. Obična planika

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) zimzeleni je grm ili malo stablo iz porodice vrujesovki prošireno diljem Mediterana i Atlantske obale Europe, a pojavljuje se i u južnoj Europi, Sjevernoj Africi, Irskoj, Palestini te na Kanarima (1, 4). Prvi ju je opisao Carl Linnaeus 1753. godine u djelu *Species Plantarum*. U Hrvatskoj ovu biljku možemo pronaći duž Jadranske obale i na otocima Mljetu, Pelješcu, Braču, Korčuli i Dugom Otoku, na glinenim i kamenim podlogama te u šumi bora (1). Zreli oblik biljke visok je od 3 do 5 metara, no neke jedinke mogu doseći visinu od čak 10 metara (1).



Slika 1. Plod, cvijet (lijevo) i grm obične planike (desno)

Preuzeto sa: blogs.ubc.ca (5)

Obična planika lako se prepoznaje po svojim rozo-bijelim, zvonolikim cvjetovima skupljenima u mirisne cvatove i po okruglim plodovima, bobama, prosječnog promjera 2 centimetra, žuto - crvene boje, bobičasto hrapave površine (Slika 1). Plod biljke je jestiv, ali najčešće se konzumira tek nakon obrade budući da pri konzumaciji veće količine svježih plodova kod ljudi izaziva probavne smetnje i ošamućenost zbog čega biljka navodno i nosi naziv "unedo" (1, 4). Naime, iz latinskog izraza *Unum edo*, što znači *jedem samo jedan*, nastaje skraćenica, unedo (1).

Mediterranska regija poznata je po tome da njeni stanovnici često koriste plodove divljeg bilja koje raste u njihovoj okolini (1). U prošlosti, mnoge od tih biljaka bile su važne za očuvanje zdravlja ljudi koji su ih koristili budući da sadrže veće količine bioaktivnih spojeva od kultiviranih biljaka (1). Zato se još i danas plod obične planike koristi za izradu alkoholnih pića, džemova, marmelada i meda, a u tradicionalnoj se medicini koristi za izradu pripravaka protiv raznih upala, zubobolje, nadutosti, dijabetesa, ateroskleroze, tromboze, hipertenzije te u borbi protiv gastrointestinalnih, urinarnih i bubrežnih bolesti (1, 4, 6).

Ovaj dugačak niz pozitivnih učinaka nije iznenađujući budući da je kemijskom analizom utvrđeno da se u vodenom ekstraktu obične planike nalaze biokativne tvari poput eteričnih ulja, tokoferola, fenola i flavonoida za koje je već ranije dokazano da djeluju blagotvorno na ljudsko zdravlje (2, 4).

1.2. Kemijski sastav obične planike

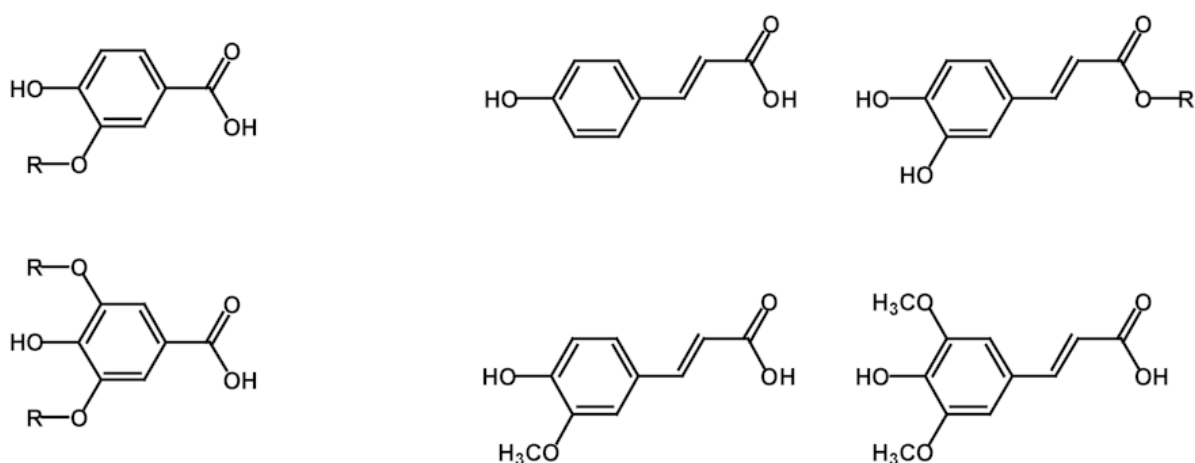
Zreli plodovi obične planike u svom sastavu sadrže visoke doze šećera (od 42% do 52% suhe mase) i minerala, pogotovo kalija i kalcija, a u nešto manjim koncentracijama pojavljuju se i eterična ulja (2, 4). Također, u plodovima se nalaze i važni antioksidansi kao što su vitamini i različiti fenolni spojevi, a ponajviše galna kiselina (7).

List obične planike sadrži nekoliko kategorija spojeva kao što su masne kiseline, terpenoidi, neki vitamini, esencijalno ulje i fenolni spojevi (3, 8).

Od masnih kiselina u listu su prisutne palmitinske kiseline, oleinske, linolenska, laurinska, miristinska, stearinska, pentadekanoična, trideciklična, behenična, margarinska te arahidinska kiselina (8). Od terpenoida su određeni α -amirin acetat, betulinska kiselina i lupeol, a od vitamina α -tokoferol (7, 9, 10). Iz lista obične planike izoliran je i niz fenolih spojeva poput tanina, fenolnih glikozida, iridoidnih glukozida te flavonoida.(2).

1.3. Polifenoli i flavonoidi

Fenolni spojevi ili polifenoli čine jednu od najmnogobrojnijih i najšire rasprostranjenih supstanci u biljnom carstvu, ima ih preko 8000 od čega je 4000 flavonoida (11, 12). Polifenoli su produkti sekundarnog metabolizma biljaka i bitni su za razvoj i reprodukciju, a proizvedeni su kao odgovor na okolišne čimbenike te kao obrana od infekcije kod ozlijeđenih biljaka (11, 13). Polifenoli mogu biti jednostavne molekule (Slika 2), kao što su fenolne kiseline ili visoko polimerizirani spojevi, kao što su tanini (11).



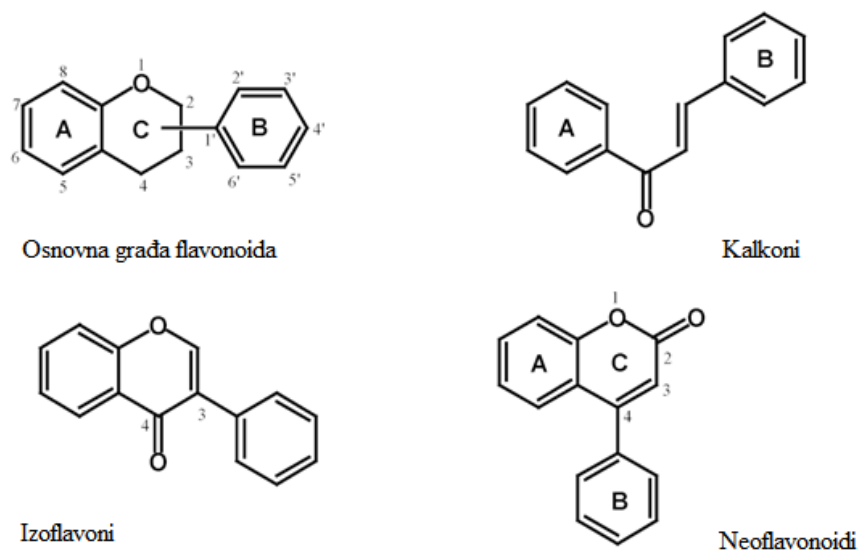
Slika 2. Fenoli u hrani – lijevo benzeenske kiseline, desno – cimetne kiseline

Preuzeto iz: Nutrition (12)

Fenoli primarno se pojavljuju u formi konjugata sa jednim ili više šećera vezanih na hidroksilnu skupnu iako može postojati i veza između šećera i aromatskog atoma ugljika (11).

Vezani šećeri mogu biti monosaharidi, disaharidi i oligosaharidi, s tim da je glukoza najčešći šećer koji pronalazimo u fenolima. Veze sa spojevima kao što su amini i lipidi te karboksilna kiselina i razne organske kiseline, također su česte (11).

S obzirom na osnovnu kemijsku strukturu fenole možemo dijeliti u različite grupe. Najbitnija od tih grupa su flavonoidi koje možemo podijeliti u više različitih razreda, neki od kojih su: flavoni, flavanoni, flavonoli i izoflavoni (Slika 3) (11, 13).



Slika 3. Strukturni prikaz flavona, izoflavona, halkona i neoflavonoida
Preuzeto iz: Nutrition (12)

Flavonoidi su najčešća i najšire rasprostranjena skupina biljnih fenola (11). Njihova uloga i aktivnost ovisi o kemijskoj strukturi. Flavonoidi se uglavnom pojavljuju u obliku difenilpropana ($C_6-C_3-C_6$) (Slika 3), rjeđe mogu biti i aglikoni i derivati glikozida, a najčešće imaju antiviralnu, antimikrobnu, antikancerogenu te hepatoprotektivnu ulogu (11, 13).

Fenoli, pogotovo flavonoidi, pokazalo se, imaju veliki antioksidativni kapacitet te se unatrag nekoliko godina sve više istraživanja bavi antioksidativnim svojstvima fenolnih spojeva i njihovim potencijalom korištenja u prehrambenoj industriji kao izvor antioksidansa koji su prijeko potrebni u borbi protiv bolesti koje uzrokuje oksidativni stres (13, 14).

1.4. Oksidativni stres

Evolucija aerobnih metaboličkih procesa kao što su respiracija i fotosinteza neizbježno su doveli do nastanka molekula koje imaju nespareni elektron u vanjskoj orbiti, odnosno, nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. reactive oxygen species) u mitohondrijima, kloroplastima i peroksisomima. ROS mogu nastati i tijekom izlaganja ionizirajućem i ne ionizirajućem zračenju, u metabolizmu nekih ksenobiotika kao što su toksini, pesticidi i herbicidi ili alkohol te pri infekcijama organizma bakterijama i virusima (15). Karakteristika ROS-a je da mogu dovesti do modifikacije i inaktivacije proteina, peroksidacije lipida, modifikacije baze DNK i uzrokovati promijene u funkcioniranju stanica (9, 15, 16).

Da bi se kontrolirale razine ROS-a u organizmu biljke proizvode različite tvari kao što su na primjer fenoli i tokoferoli koje djeluju kao antioksidansi. Danas, antioksidansi mogu biti

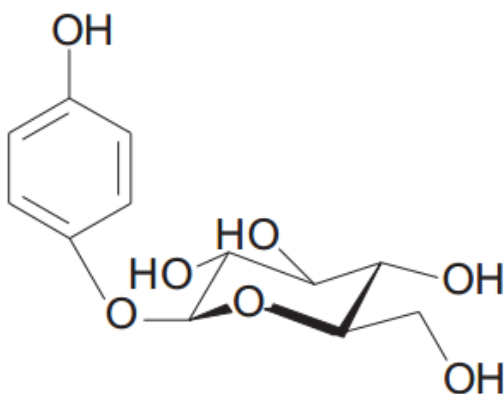
prirodni ili sintetički proizvedeni (4). Oni dobiveni prirodnim putem, naravno, daleko su kvalitetniji od onih umjetno proizvedenih. Spojevi koji se nalaze u običnoj planici mogli bi, dakle, biti od velike važnosti za prehrambenu, farmaceutsku i kemijsku industriju.

Oksidativni stres, odnosno djelovanje ROS-a u organizmu, danas se smatra jednim od najvećih i najvažnijih čimbenika u razvitku mnogih autoimunih bolesti, različitih upala, raka, Parkinsonove bolesti, mrene, srčanih bolesti, ateroskleroze i preranog starenja (4). Jedan od načina smanjivanja i uklanjanja pojavnosti ovih bolesti uvođenje je namirnica, koje sadrže prirodne tvari s antioksidativnim svojstvima, u ljudsku prehranu. Na taj se način organizmu osiguravaju spojevi koji mu pomažu da se riješi slobodnih radikala i da ukloni opasnost od staničnog oksidativnog stresa (4).

Jedan od najvažnijih fenolnih spojeva, odnosno antioksidansa, koji sadrži obična planika je arbutin.

1.5. Arbutin

Arbutin je glikolizirani hidrokinon (Slika 4) koji možemo pronaći u kori, listu i plodu vrsta iz porodica glavočika i ružovki, a pogotovo u porodici vrjesovki kojoj pripadaju i medvjedka (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) i obična planika (3). Ovaj fenolni glikozid sekundarni je metabolit koji biljke formiraju u obrani protiv infekcija i pri stresnim situacijama kao što su iznimno visoke ili niske temperature (17).



Slika 4. Kemijska struktura arbutina

Preuzeto iz: The Journal of Clinical Pharmacology (18)

Hidroksilne skupine u kemijskoj građi čine arbutin i hidrokinon antioksidansima. Hidrokinon ima 2 hidroksilne skupine podložne oksidaciji pa se stoga smatra jačim

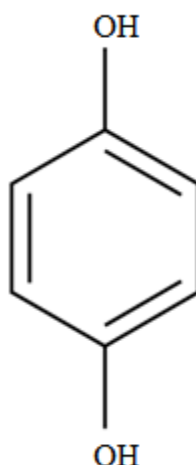
antioksidansom neko arbutin (10). Ipak, u istraživanjima na eritrocitima i fibroblasima arbutin pokazuje veliki antioksidativni kapacitet koji ima dugotrajni učinak od hidrokinina (10).

Arbutin se najčešće koristi kao diuretik i antiseptik pri blažim urinarnim infekcijama (19). Nakon konzumacije, arbutin se absorbira preko nosača glukoze u debelom crijevu. Tu se uz pomoć intestinalne flore metabolizira u glukuronide i sulfatne konjugate koji se najviše izlučuju u urinu (18). *In vivo*, pokazano je da pri konzumaciji jedne doze arbutina (u obliku suhog ekstrakta bobica medvjedke), gdje je arbutin standardiziran na 800 miligrama po dozi, u uzorku urina konzumenta 5 dana nakon uzimanja doze nije primijećen rast bakterija (18).

S druge strane, u intestinalnoj mikroflori nalaze se bakterije *Eubacterium ramulus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacteroides distasonis* i *Bifidobacterium adolescentis* koje mogu metabolizirati arbutin do hidrokinona (hepatotoksičnog, nefrotoksičnog, mutagenog i kancerogenog spoja), a i sam je arbutin u prisutnosti citosolnih djelova *Eubacterium ramulus*, *Bacteroides distasonis* pokazao mutagena svojstva (20, 23).

1.6. Hidrokinon

Hidrokinon je aromatski organski spoj, fenol, koji se u prirodi pojavljuje u biljkama, a proizvodi se i u komercijalne svrhe (Slika 5). Godišnje se proizvede otprilike 50 000 tona hidrokinona koji se koristi u fotokemijskim postupcima, kao antioksidans za masti i ulja, u proizvodnji boja i motornih goriva te kao polimerizacijski inhibitor i izbjeljivač kože u kozmetici (3, 24).

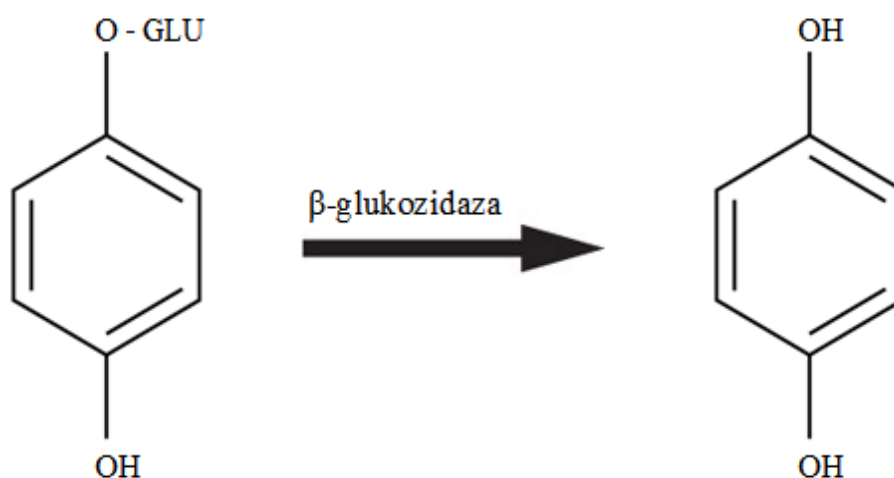


Slika 5. Kemijska struktura hidrokinona

Budući da interferira s radom tirozinaze, enzimom koji je primarno uključen u rane stadije melanogeneze, hidrokinon se prije smatrao najučinkovitijim inhibitorom melanogeneze *in vitro* i *in vivo* (25). I danas ga se ponekad koristi kao depigmentacijska tvar za liječenja melasme, kloazme i drugih dermatoloških poremećaja koje karakterizira hiperpigmentacija melaninom (25). Ipak, novijim istraživanjima dokazano je da hidrokinon zapravo slabo inhibira humanu tirozinazu te da je njegov konačni citotoksični učinak izraženiji od same inhibicije (26). Upravo je zato on u EU zabranjen u kozmetičkim proizvodima, ali se u ljekarnama SAD-a može pronaći u preparatima s do 2% hidrokinona.

Također, hidrokinon se pokazao toksičan za različite organe pogotovo bubrege, a za ljude je opasan u većim količinama i može izazvati tinitus, vrtoglavice, glavobolje, mučnine, povraćanje, edem unutarnjih organa, cijanozu, konvulzije, delirij i kolaps (24). Kronično izlaganje hidrokinonu, na primjer na radu, dovodi do iritacije očiju i pogoršanja vida (24).

Hidrokinon ima i genotoksičnu aktivnost, odnosno sposobnost da inhibira ljudsku izomerazu II (što je jedan od utvrđenih načina indukcije leukemije kod čovjeka), te ometa sastavljanje mikrotubula i diobenih vlakana (3). Negativni učinci hidrokinona na ljudsko zdravlje počinju nakon njegove autooksidacije ili enzimima pomognute aktivacije. Hidrokinon se aktivira β -glukozidazom koja djeluje na arbutin te odvajanja šećera od fenolne skupine (Slika 6) (3). Potom se hidrokinon metabolizira i nastaju uglavnom glutationski konjugati koji stvaraju adukte i nepovoljno utječu na genetički materijal (24). Prostaglandin H sintetaza, citokrom P450 2E1 i mijeloperoksidaza također mogu povećati stvaranje adukata DNA i pojačati mutagenost hidrokinona (3).



Slika 6. Metaboliziranje arbutina u hidrokinon uz pomoć enzima β -glukozidaza

Trebalo bi dodati da je u današnjem okolišu velik izvor hidrokinona benzen, važna industrijska kemikalija, široko rasprostranjen zagađivač i kancerogen za ljude (27).

1.7. Sastav krvi

Krv je tjelesna tekućina koja protječe kroz srčano-krvožilni sustav organizma. Crvena je, neprozirna i gusta te posebna mirisa i slana okusa. Uloga krvi je u funkciji disanja tj. prijenos kisika i ugljikova dioksida, prijenosu hranjivih tvari, otpadnih tvari, hormona, enzima, vitamina itd., regulaciji volumena tjelesnih tekućina i acido-bazne ravnoteže, te regulaciji tjelesne temperature, a ima i veliku zaštitnu ulogu. Ukupna količina krvi u tijelu odrasla čovjeka je 5 – 6 litara, što je oko 8% ukupne tjelesne mase. Krv se sastoji od tekućeg dijela koji se naziva krvna plazma, te staničnih dijelova – eritrocita, leukocita i krvnih pločica – trombocita (28).

1.8. Hematološki parametri u krvi

Hematološki parametri opisuju brojnost i karakteristike staničnih dijelova krvi eritrocita, leukocita i trombocita.

1.8.1. Broj eritrocita

Crvene krvne stanice odnosno eritrociti su bikonkavne, disku nalik, stanice bez jezgre. Oni prenose kisik i ugljikov dioksid, produkte disanja, kroz krvožilni sustav (28). Unatoč svojoj dobroj prilagođenosti oksidativnom i osmotskom stresu, koji trpe u cirkulaciji, eritrociti se s vremenom troše i uništavaju. Preživljavanje eritrocita prilično je uniformno i potrebno je otprilike 120 dana otkada se oslobode u krvotok do sekvestracije ostarjelih eritrocita u jetri i slezeni. Starenje eritrocita očituje se u tome da na svojoj površini zadobivaju oštećenja koja uzrokuje kisik odnosno oksidacija. Broj eritrocita (RBC, engl. red blood cell count) označava brojnost crvenih krvnih stanica u volumenu uzorka. Prosječna vrijednost broja eritrocita u čovjeka iznosi $4,7-5,2 \times 10^{12}/L$ (28).

1.8.2. Volumeni udio crvenih krvnih stanica u krvi

Volumeni udio crvenih krvnih stanica nazivamo i hematokrit (Hct, engl. hematocrit) (28). On obično iznosi 45% volumena krvi. S obzirom na ulogu eritrocita, vrijednost hematokrita pokazuje kolika je sposobnost krvi da prenese kisik po tijelu. Smanjena vrijednost hematokrita može ukazivati na anemiju, otkazivanje bubrega, hemolizu, krvarenje ili trudnoću,

a povećana na policitemiju, dehidraciju, probleme s plućima, pušenje i korištenje anaboličkih steroida (28).

1.8.3. Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) je protein koji prenosi kisik i čini 95 % suhe mase eritrocita. Svaka se tetramerna molekula sastoji od četiri molekule hema u kojima se nalazi željezo za koje se veže kisik. Molekule hema vežu se na polipeptid globin te nastaje hemoglobin. Količinu hemoglobina određujemo tako da se lizira razrijeđena suspenzija eritrocita kojoj se dodaje ferocijanid da se stvori cijanomethemoglonin kako bi se spektrofotometrijski mogao odrediti hemoglobin (28).

1.8.4. Srednji stanični volumen eritrocita i indeks heterogenosti populacije eritrocita

Srednji stanični volumen (MCV, engl. mean corpuscular volume) jedan je od indeksa koji se određuje za eritrocite budući da pruža uvid u patofiziologiju poremećaja crvenih krvnih zrnaca te se koristi za klasificiranje anemija i određivanje njihovog uzroka. On se izračunava iz vrijednosti hematokrita, hemoglobina i broja eritrocita i označava volumen prosječne crvene krvne stanice (28). MCV se izražava u femtolitrima (fL). Izvor pogreške kod mjerenja može biti hiperglikemija koja uzrokuje povećanje volumena stanice i lažno očitavanje.

Za analizu varijabilnosti veličine crvenih krvnih stanica u uzorku koristi se i indeks heterogenosti populacije eritrocita (RDW, engl. red blood cell distribution width) (28). To je mjera koja kvantificira heterogenost staničnog volumena odražavajući tako raspon veličina crvenih krvnih stanica unutar uzorka odnosno varijabilnost veličine eritrocita (28, 29).

Vrijednosti RDW-a određuju se iz krivulja raspodjele eritrocita koje generiraju automatizirani brojači stanica. RDW se izražava u postotcima i pokazuje varijaciju veličine, a ne točne zapremnine ili površine zasebnih stanica. Iz rezultata se može očitavati heterogenost ili homogenost populacije eritrocita (28).

1.8.5. Srednja stanična vrijednost hemoglobina i srednja količina hemoglobina u eritocitu

Srednja stanična vrijednost hemoglobina (MCHC, engl. mean corpuscular hemoglobin concentration) opisuje koliko prosječno hemoglobina ima u volumenu crvenih krvnih stanica. MCHC se izražava u gramima hemoglobina po decilitru eritrocita što znači da je ovaj parametar pokazatelj količine hemoglobina u eritocitu s obzirom na njegovu veličinu (28).

MCHC je stabilan parametar, budući da je ograničen topljivošću hemoglobina, i u

normalnim uvjetima ne bi trebao prelaziti vrijednost od 37 grama po decilitru. Iznad ovih vrijednosti došlo bi do kristalizacije hemoglobina pa bi se sve rezultate iznad granice moglo smatrati pogreškom (28, 29).

Uz MCHC možemo koristiti i srednju količinu hemoglobina u eritrocitu (MCH, engl. mean corpuscular hemoglobin). Ova mjera odražava masu hemoglobina u prosječnom eritrocitu, a izračunava se tako da vrijednost hemoglobina podjeli na broj eritrocita te se izražava u pikogramima (28).

1.8.6. Broj leukocita

Bijele krvne stanice, odnosno leukociti, ključan su dio imunološkog sustava. To su stanice koje nastaju dijelom u koštanoj srži (granulociti i monociti), a dijelom u limfnim tkivima (limfociti i plazma stanice) te se one u krvi transportiraju u dijelove organizma u kojima se pojavljuju velike upale ili infekcije te pružaju brzu i snažnu obranu od infektivnih čestica. Neutrofili, eozinofili i bazofili su stanice sa segmentiranim jezgarama, dok u citoplazmi sadrže granule te ih stoga nazivamo još i granulociti. Monociti, limfociti i plazma stanice imaju samo jednu jezgru, a u citoplazmi ne sadrže granule te ih nazivamo agranulociti (16).

Pri analizi leukocita određuje se, kao i kod eritrocita, njihova brojnost (WBC, engl. white blood cell count). Iako ih normalno u volumenu krvi ima malo, otprilike 1%, što je daleko manje od 45% koliko ima crvenih krvnih zrnaca, budući da su bijela krvna zrnca u cirkulaciji odgovorna za imunološki odgovor, njihova je brojnost bitan pokazatelj stanja imunološkog sustava (30). Smanjeni broj leukocita stanje je koje se naziva leukopenia, a povećani leukocitoza (30).

Populaciju bijelih krvnih stanica možemo detaljnije analizirati tako da odredimo točan broj pojedinih vrsta bijelih krvnih stanica. Limfociti su u krvnoj slici uobičajeno predstavljeni kraticom LYM, granulociti GRA, a monociti i eozinofili čine skupinu pod kraticom MID.

1.8.7. Broj trombocita

Trombociti su krvne stanice bez jezgre u obliku diska koje mogu biti velike od 1 do 4 milimetra. Oni nastaju raspadom megakariocita u koštanoj srži ili vrlo brzo nakon što se megakariocit oslobodi u krv, pogotovo prilikom provlačenja megakariocita kroz kapilare. Osim skladištenja velikih količina kalcija i proizvodnje ATP-a i ADP-a, trombociti imaju i ulogu u popravku ozlijeđenih vaskularnih tkiva. Zbog svojeg glikoprotinskog omotača trombociti se

lijepe na ozlijeđene dijelove krvnih žila dok su velike količina fosfolipida na njihovoj ovojnici odgovorne za aktivaciju više stadija u zgrušavanje krvi (16).

U normalnim uvjetima u μL krvi nalazi se oko $2-4 \times 10^5$ trombocita. Ako je trombocita manje od standardnih vrijednosti to se stanje naziva trombocitopenija, a mogu ga uzrokovati, primjerice, virus hepatitisa, leukemija i limfom te kemoterapija i zračenje. Trombocitoza je stanje povećanog broja trombocita te ga mogu ga uzrokovati rak pluća i probavnog sustava, artritis, lupus i neke vrste anemija (29).

Kao i kod eritrocita, i kod trombocita postoje parametri koji se mjere kako bi ih se preciznije opisalo. To su volumeni udio trombocita u uzorku krvi (PCT, engl. plateletcrit), koji se još naziva i trombokrit, zatim indeks heterogenosti populacije trombocita (PDW, engl. platelet distribution width), mjera koja odražava raspon veličina trobocita unutar uzorka odnosno varijabilnost njihove veličine, te prosječni volumen trombocita (MPV, engl. mean platelet volume), parametar koja se izračunava iz vrijednosti PCT-a pomnoženog s PDW-om i podjeljenim na broj trombocita (29).

1.9. Biokemijski parametri krvi

Biokemijski parametri krvi ili biokemija krvi opisuje tvari koje nalazimo u krvi, a u tijelu nastaju biokemijskim procesima u različitim organima. Mjerenje biokemijskih parametara nam pomaže u praćenju funkcioniranja pojedinih organa (28).

1.9.1. Aspartat i alanin aminotransferaza

Aminotransferaze su enzimi koji kataliziraju prijenos amino skupne sa α -aminokiselina na α -okso kiselinu. U tkivima su najproširenije i najčešće mjerene aminotransferaze: aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT). Aspartat aminotansferazu možemo pronaći u jetri, srcu, skeletnim mišićima, bubregu, mozgu, eritrocitima i plućima (31). Alanin aminotransferaza ima sličan raspored po tkvima, ali je njezina aktivnost veća u jetri te je ona, kada je povećana u plazmi, bolji pokazatelj bolesti jetre od AST-a. Općenito, povećana aktivnost AST-a i ALT-a u plazmi kod bolesti jetre dolazi od oštećenih ili nekrotičnih hepatocita. Također, budući da su tako široko prisutni u tkivima, nije iznenađujuće da se povećana aktivnost enzima aminotransferaze može zamijetiti i pri bolestima kao što su rabdomioliza, gdje se enzimi oslobađaju iz oštećenih mišićnih stanica. Povećanje aminotransferaza zbog bolesti jetre ili skeletnih i srčanog mišića možemo razlikovati tako da se mjeri kreatin kinaza ili za srce specifičan troponin (31).

1.9.2. Laktat dehidrogenaza

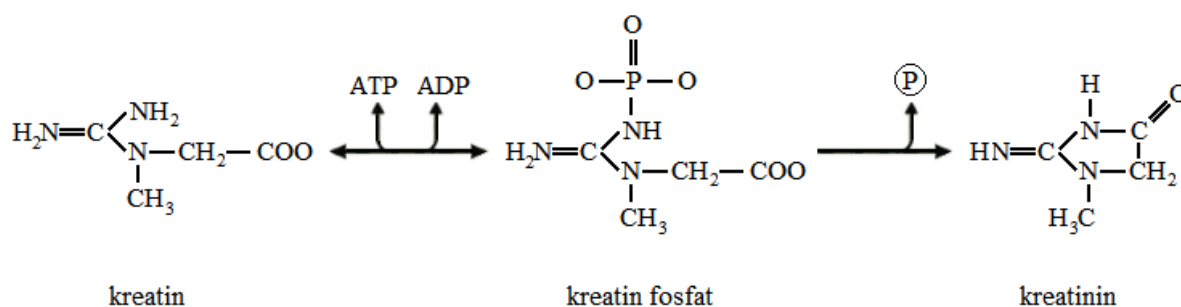
Laktat dehidrogenaza (LDH) enzim je koji katalizira reverzibilnu promjenu piruvata u laktat u prisutnosti koenzima NADH. LDH je tetramer s dvije vrste podjedinica s malim razlikama u sekvencama aminokiselina i nazivamo ih H i M. Ove se podjedinice mogu kombinirati nasumično jedna s drugom formirajući tako pet izoenzima koji imaju sastav H_4 , H_3M , H_2M_2 , HM_3 , M_4 . M podjedinica najviše se nalazi u skeletnim mišićima i jetri, dok se H podjedinica najviše nalazi u srcu. H_4 i H_3M izoenzimi se najviše nalaze u srcu i crvenim krvnim zrnima. H_2M_2 u mozgu, HM_3 i M_4 prevladavaju u jetri i skeletnim mišićima (32). Dakle, svako tkivo ima za sebe karakterističan izoenzimski uzorak što je iznimno bitno za dijagnostiku u medicini. Budući da je LDH topljiv, citoplazmatski protein on se oslobađa u krv pri infarktu miokarda, infektivniom hepatitisu i bolesti mišića koje uključuju staničnu smrt. Prema tome, uzorak LDH izoenzima u krvi pokazatelji su iz kojeg su se točno tkiva oslobodili izoenzimi te se može odrediti o kojem se poremećaju u organizmu radi pa se stanje može bolje pratiti i liječiti (32).

1.9.3. Ukupni proteini

Koncentracija proteina u plazmi odražava ravnotežu između dostupnosti njihovih prekursora i brzinu njihove sinteze, oslobađanja i uklanjanja, a i opsega odnosno volumena u kojem se proizvode. Stoga nije iznenađujuće da su kod pacijenata s bolestima jetre vrijednosti ukupnih proteina veoma varijabilne (31). Mjerenje nekih plazmatskih proteina, kao što su albumin ili proteina koagulacije, mogu pružiti korisne opće informacije o funkciji jetre, dok se analizom drugih kao što su α_1 – antitripsin ili ceruloplazmin koriste za dijagnozu specifičnih stanja koja pogađaju jetru (31).

1.9.4. Kreatinin

Kreatinin je organski spoj koji nastaje pri metaboliziranju kreatina u skeletnim mišićima (Slika 7), te se kao takav uklanja iz organizma uz pomoć bubrega. Nakon filtracije u glomerulu zbog svoje veličine kreatinin se gotovo uopće ne može apsorbirati preko membrane tubula te se gotovo sav filtrirani kreatinin izluči u urin (20). Stoga je logično da svaka promjena u vrijednostima kreatinina u krvi govori o problemu u radu bubrega (20).



Slika 7. Metaboliziranje kreatina u kreatin fosfat i kreatinin te ponovno u kreatin

1.9.5. Glukoza

Glukoza je važan ugljikohidrat koji stanice koriste za različite anaboličke procese i da proizvode energiju, a u normalnim fiziološkim uvjetima ona je i jedini izvor energije za mozak. Glukoza se nabavlja iz ugljikohidrata u prehrani koji u organizam ulaze u obliku monosaharida, disaharida i polisaharida, ali nastaje i sintezom u jetri (33). Glukoza i mnogi drugi monosaharidi transportiraju se preko površine probavila u portalnu venu jetre, a zatim glukoza odlazi u jetru i druga tkiva. U stanice ulazi preko nosača na membrani budući da je glukoza polarna molekula i kao takva ne može preći membranu sama. Tamo se pretvara u masne kiseline, amino kiseline i glikogen (jetra sprema višak glukoza u obliku glikogena, a dio se pretvara i u masne stanice) ili se oksidira u raznim kataboličkim procesima u stanici (33). Normalna koncentracija glukoze u krvi iznosi 5 mM, a za kontrolu njezine razine nakon obroka i tijekom posta odgovorni su hormoni inzulin i glukagon. Inzulin pospješuje prijenos glukoze u stanicu dok glukagon potiče jetru na proizvodnju glukoze koja u konačnici povećava razinu šećera u krvi. Kada mehanizmi regulacije šećera u krvi više ne funkcioniraju dolazi do stanja hiperglikemije odnosno povišene razine šećera u krvi i hipoglikemije odnosno stanja sniženog šećera u krvi (33).

1.9.6. Urea

Urea je krajnji produkt metabolizma proteina. Ona se sintetizira u jetri, a zatim se prenosi krvlju do bubrega koji ju onda izlučuje iz tijela (34). Bubrezi filtriraju velike količine plazme, reapsorbiraju ono što je potrebno, a za eliminaciju iz tijela ostavljaju koncentriranu otopinu nepotrebnih ostataka metabolizma (34). Povećane vrijednosti uree u tijelu, odnosno krvi, ukazuju na bolesti bubrega ili povećan katabolizam proteina u organizmu. Abnormalno niske razine uree iznimno su rijetke te ukazuju na ozbiljne bolesti jetre (34).

1.10. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je istražiti moguće toksično djelovanje ekstrakta lista obične planike (*Arbutus unedo* L.), arbutina i hidrokinona primjenjivanih oralno u dozi od 200 mg/kg tijekom 14 ili 28 dana. Istraživanje smo proveli na modelu *in vivo* (štakori soja Lewis) analizom hematoloških i biokemijskih parametara u krvi.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Priprema otopina

Listovi obične planike (*Arbutus unedo* L.) prikupljeni su po principu slučajnosti s većeg broja stabala i grmova na području Malog Lošinja. Uzorci listova osušeni su u tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi te samljeveni u prah u laboratorijskom mlinu. Iz dobivenog praha priređen je vodeni ekstrakt (35).

U pripremi otopina korišten je 98 %-tni arbutin i 99 %-tni hidrokinon proizvođača Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka). Vodena otopina pripremljena je otapanjem arbutina i hidrokinona u redestiliranoj vodi.

Akutna oralna toksičnost hidrokinona LD₅₀ za štakore iznosi između 298-390 mg/kg dnevno, a koncentracija od 400 mg/kg dnevno u preliminarnom je pokusu pokazala toksično djelovanje hidrokinona na središnji živčani sustav štakora (36). Iz tog je razloga korištena polovica doze (200 mg/kg) koja izaziva akutnu oralnu toksičnost kod štakora.

2.2. Pokusne životinje

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su štakori soja Lewis starosti oko 60 dana oba spola. Životinje su uzgojene u uzgajalištu Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su okoćene i uzgojene u standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja (glodavaca). Hranjene su standardnom laboratorijskom hranom (Standard Diet GLP, 4 RF 1, Mucedola, Settimo Milanese, Milano, Italija), uz stalno dostupnu vodu *ad libitum*. Za provođenje pokusa na životinjama dobivena je suglasnost Etičkog povjerenstva PMF-a (URBROJ:251-58-10617-14-104). Istraživanje je provedeno u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006.) i prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, NN 55/13.

2.3. Tretman životinja

Životinje su slučajnim odabirom raspoređene u 16 skupina. Svaku skupinu čine po 4 životinje istog spola. Životinje su tretirane istraživanim tvarima oralno gastralnom kanilom tijekom 14 i 28 dana u skladu s odredbom 407 OECD (engl. Organisation for Economic Co-operation and Development) i US EPA (engl. United States Environmental Protection Agency) preporukama o trajanju kratkoročnog toksikološkog tretiranja (OECD 407, 2008) vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg), arbutinom (200 mg/kg) ili hidrokinonom (200

mg/kg). Kontrolna je skupina tretirana istim volumenom redestilirane vode i održavana je u istim uvjetima.

Žrtvovanje životinja vršeno je 24 sata nakon primjene zadnje doze uz adekvatno anesteziranje i analgeziranje intraperitonealnom primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar ketamin) (0,8 mL/kg) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar ksilazin) (0,6 mL/kg) radi uzimanja uzoraka krvi.

2.4. Analiza hematoloških i biokemijskih parametara u uzorcima krvi

Analiza krvi štakora vršena je nakon 14 odnosno 28 dana trajanja tretmana. U svrhu analize hematoloških parametara krv je sakupljena punkcijom aorte u heparizirane vakuteinere (BD Microtainer Becton, Dickinson & co., USA). Analizirani su hematološki parametri: broj eritrocita (RBC), broj leukocita (WBC), hematokrit (Htc), hemoglobin (Hb), srednji korpuskularni volumen (MCV), srednja stanična koncentracija hemoglobina (MCHC), indeks heterogenosti populacije eritrocita (RDW), prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH), broj trombocita (PLT), trombokrit (PCT), indeks heterogenosti populacije trombocita (PDW) i prosječni volumen trombocita (MPV) u automatskom hematološkom analizatoru Abacus Junior Vet (Diatron, HUN) pri aperturi od 80 µL. Korišteno je razrjeđenje od 1:32000 kod broja eritrocita i 1:196 kod broja leukocita.

Za analizu biokemijskih parametara krvi korišten je serum. Serum iz krvi štakora izoliran je na način da je epruveta pune krvi dobivena punkcijom iz aorte stajala 30 minuta u hladnjaku na + 4°C, te je nakon toga centrifugirana 5 minuta na 2500 okretaja. Potom je izdvojen serum iz kojeg su određeni biokemijski parametri krvi: aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), laktat dehidrogenaza (LDH), ukupni proteini, kreatinin, glukoza i urea pomoću automatskog biokemijskog analizatora Alcyon 300 (Abbott, USA).

2.5. Statistička obrada podataka

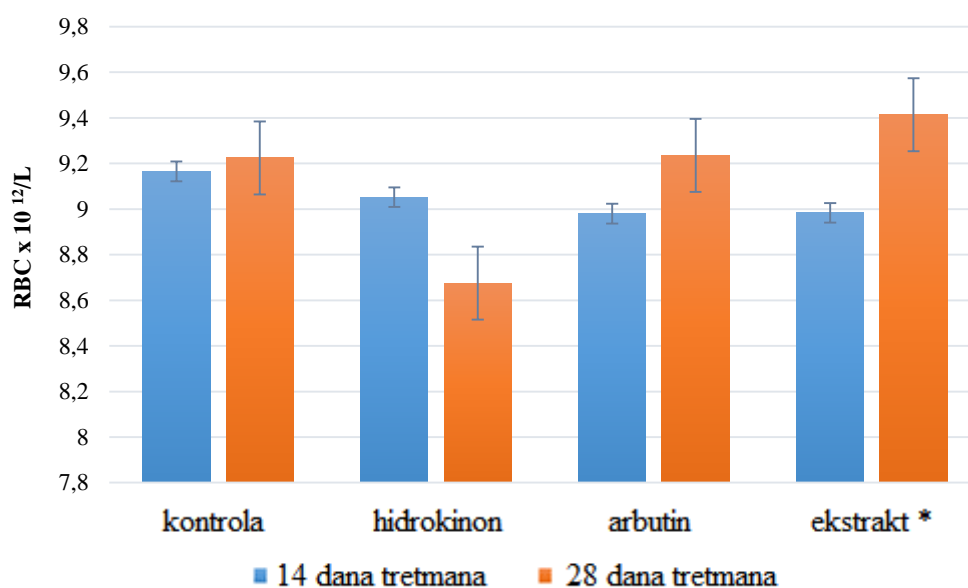
Rezultati su obrađeni metodama deskriptivne statistike, t-testa i analize varijance-ANOVA, pomoću računalnih programa Statistica i Excel. T-testom testirane su razlike između kontrolne skupine i skupina tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u svakom od tretmana. Analiza varijance-ANOVA uz post hoc Scheffeoov test korištena je kako bi se analizirala razlika između rezultata tretmana 14 i 28 dana i razlika između svih skupina testiranih životinja. Granica statističke značajnosti postavljena je kao $p < 0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Hematološki parametri

3.1.1. Analiza broja eritrocita i indeksa heterogenosti populacije eritrocita

U mužjaka tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana uočen je smanjeni broj eritrocita u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 8). Najniži broj eritrocita uočen je u skupini tretiranoj arbutinom. U mužjaka tretiranih hidrokinonom tijekom 28 dana uočen je smanjeni broj eritrocita, a kod onih tretiranih arbutinom i ekstraktom lista obične planike broj eritrocita je povećan u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 8). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima, korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije utvrđena.

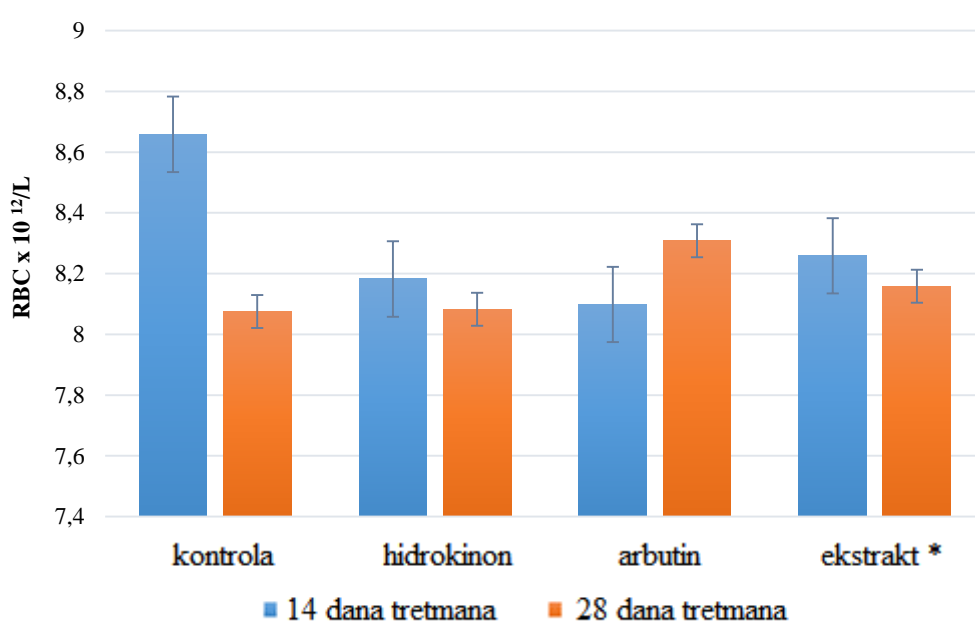


Slika 8. Srednje vrijednosti broja eritrocita i standardne devijacije u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg oralno tijekom 14 odnosno 28 dana

*ekstrakt lista obične planike

┐- standardna devijacija

U ženki tretiranih hidrokinom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana uočen je smanjeni broj eritrocita u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 9). Najniža vrijednosti broja eritrocita zabilježena je kod skupine tretirane arbutinom. Nasuprot tome, u tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast broja eritrocita u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 9) i to najviše kod skupine tretirane arbutinom. Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima, korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije utvrđena.



Slika 9. Srednje vrijednosti broja eritrocita i standardne devijacije u ženki štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 odnosno 28 dana

*ekstrakt lista obične planike

┐- standardna devijacija

U vrijednostima indeksa heterogenosti populacije eritrocita (RDW-a), u mužjaka tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana, uočen je pad kod skupina tretiranih hidrokinonom i arbutinom dok je kod skupine tretirane ekstraktom lista obične planike zabilježen blagi porast vrijednosti RDW-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 1). Isto tako, nakon 28 dana tretmana, pad vrijednosti RDW-a zabilježen je u skupinama tretiranim arbutinom i hidrokinonom dok je skupina tretirana ekstraktom zabilježila porast u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 1). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima, korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije utvrđena.

Tablica 1. Vrijednosti indeksa heterogenosti populacije eritrocita (RDW) (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) kod mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

RDW %		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
kontrola	18,33 \pm 0,35	18,39 \pm 0,38
hidrokinon	18,20 \pm 0,35	18,36 \pm 0,57
arbutin	18,04 \pm 0,41	18,11 \pm 0,24
ekstrakt*	18,41 \pm 0,29	18,53 \pm 0,18

*ekstrakt lista obične planike

Tablica 2. Vrijednosti indeksa heterogenosti populacije eritrocita (RDW) (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) kod ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

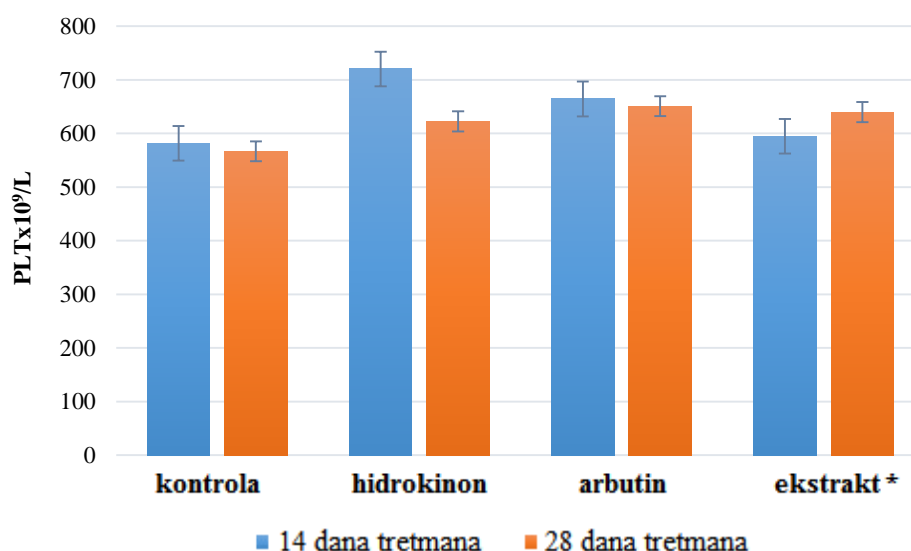
RDW %		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
kontrola	17,60 \pm 0,13	17,75 \pm 0,27
hidrokinon	17,45 \pm 0,32	17,74 \pm 0,23
arbutin	17,76 \pm 0,21	17,73 \pm 0,23
ekstrakt*	17,55 \pm 0,38	17,64 \pm 0,19

*ekstrakt lista obične planike

Vrijednosti RDW-a pale su u ženki tretiranih hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana dok je kod skupine tretirane arbutinom zabilježen porast vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 2). Nakon 28 dana tretmana pad distribucije eritrocita po volumenu zabilježen je u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 2). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima, korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije utvrđena.

3.1.2. Analiza broja trombocita i vezanih parametara

U skupinama mužjaka tretiranih 14 dana ekstraktom lista obične planike, arbutinom i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg uočen je povećan broj trombocita u odnosu na kontrolnu skupinu, najviše kod skupine tretirane hidrokinonom (Slika 10). Isto tako, u tretmanu tijekom 28 dana povećan broj eritrocita, u odnosu na kontrolnu skupinu, zabilježen je u svim skupinama. Ovaj put najviše kod skupine tretirane arbutinom (Slika 10). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima, korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije utvrđena.

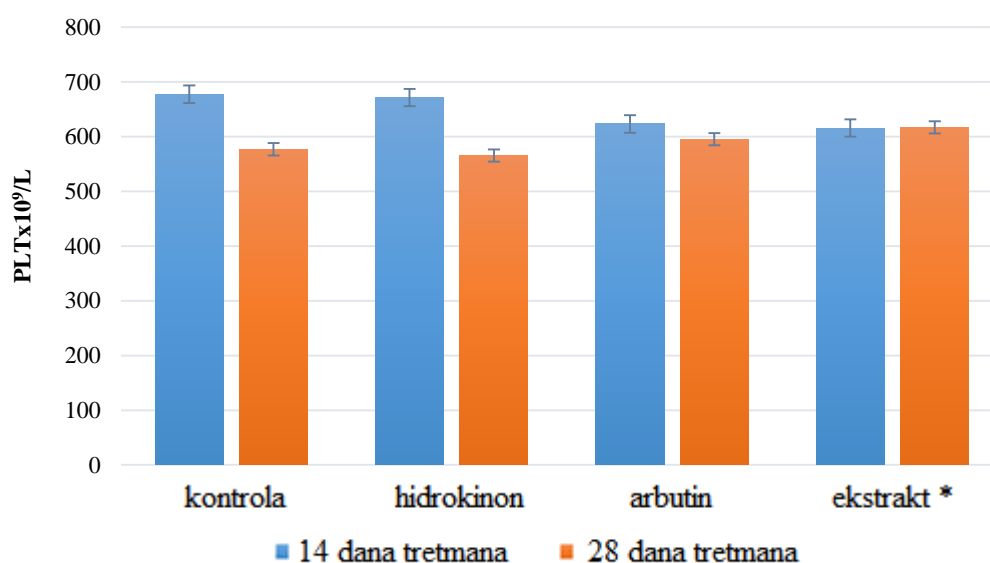


Slika 10. Srednje vrijednosti broja trombocita (PLT) i standardne devijacije u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 odnosno 28 dana

*ekstrakt lista obične planike

┐- standardna devijacija

U ženki tretiranih ekstraktom lista obične planike, arbutinom i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana uočen je smanjeni broj trombocita u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11). Nasuprot tome, nakon 28 dana tretmana pad broja trombocita zabilježen je u skupini tretiranoj hidrokinonom dok je u skupinama tretiranim arbutinom i ekstraktom lista obične planike zabilježen porast broja trombocita u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima, korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije utvrđena.



Slika 11. Srednje vrijednosti broja trombocita (PLT) i standardne devijacije u ženki štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg oralno tijekom 14 odnosno 28 dana

*ekstrakt lista obične planike

┐- standardna devijacija

U mužjaka tretiranih ekstraktom lista obične planike, arbutinom i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana vrijednosti trombokrita, odnosno PCT-a, povišene su u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 3). Isto tako, nakon tretmana 28 dana povećanje vrijednosti PCT-a, u odnosu na kontrolnu skupinu, zabilježen je u svim skupinama, osim u onoj tretiranoj hidrokinonom koja ima vrijednost PCT-a jednaku kontrolnoj skupini (Tablica 3).

U skupinama ženki štakora soja Lewis tretiranih ekstraktom lista obične planike i arbutinom u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana uočen je smanjeni PCT u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine tretirane hidrokinonom u dozi od 200 mg/kg tijekom 14 dana zabilježena vrijednost jednaka kontrolnoj skupini (Tablica 4). Nasuprot tome, nakon 28 dana tretmana pad PCT-a zabilježen je u skupini tretiranoj hidrokinonom dok je u skupinama tretiranim arbutinom i ekstraktom lista obične planike zabilježen porast PCT-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4).

Nakon 14 dana tretmana, u mužjaka tretiranih ekstraktom lista obične planike, arbutinom i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg vrijednosti MPV-a snižene su u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 3). Isto tako, nakon tretmana 28 dana smanjenje vrijednosti MPV-a, u odnosu na kontrolnu skupinu, zabilježen je u svim skupinama (Tablica 3).

U skupinama ženki ženki štakora soja Lewis tretiranih ekstraktom lista obične planike i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana uočen je smanjeni MPV u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine tretirane arbutinom u dozi od 200 mg/kg tijekom 14 dana zabilježena povećana vrijednost MPV-a u odnosu na kontrolu skupinu (Tablica 4). Nasuprot tome, nakon 28 dana tretmana pad MPV-a zabilježen je u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4).

Pad vrijednosti PDW-a u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježene su u mužjaka tretiranih ekstraktom lista obične planike, arbutinom i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana (Tablica 3). Isto tako, nakon tretmana 28 dana smanjenje vrijednosti PDW-a, u odnosu na kontrolnu skupinu, zabilježen je u skupinama tretiranim arbutinom i ekstraktom lista obične planike dok je kod skupine tretirane hidrokinonom zabilježen porast vrijednosti (Tablica 3).

Vrijednosti PDW-a smanjene u odnosu na kontrolnu skupinu i u ženki tretiranih ekstraktom lista obične planike, arbutinom i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana (Tablica 4). Isto tako, nakon 28 dana tretmana pad PDW-a zabilježen je u skupini tretiranoj hidrokinonom dok je u skupinama tretiranim arbutinom i ekstraktom lista obične planike zabilježen porast PDW-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4).

T- test i analiza varijance- ANOVA korišteni su kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima PCT, MPV i PDW te nije pronađena statistički značajna razlika.

Tablica 3. Vrijednosti (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) trombokrita (PCT), srednjeg volumena trombocita (MPV) i indeksa heterogenosti populacije trombocita (PDW) kod mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg

	Kontrola	Hidrokinon	Arbutin	Ekstrakt*
14 dana				
PCT %	0,0037 \pm 0,0005	0,0044 \pm 0,0005	0,0040 \pm 0,0005	0,0039 \pm 0,0004
MPV fL	6,1333 \pm 0,2658	6,0500 \pm 0,1773	6,1000 \pm 0,2928	6,1125 \pm 0,2100
PDW %	35,8833 \pm 0,3710	35,2750 \pm 0,7206	35,0625 \pm 0,8943	35,2500 \pm 1,4061
28 dana				
PCT %	0,0038 \pm 0,0005	0,0038 \pm 0,0005	0,0040 \pm 0,0004	0,0004 \pm 0,0005
MPV fL	6,3000 \pm 0,2295	5,9250 \pm 0,0835	6,2550 \pm 0,2828	5,9500 \pm 0,1909
PDW %	35,5625 \pm 0,5939	34,2000 \pm 1,0610	36,0125 \pm 0,7510	35,0375 \pm 0,9914

*ekstrakt lista obične planike

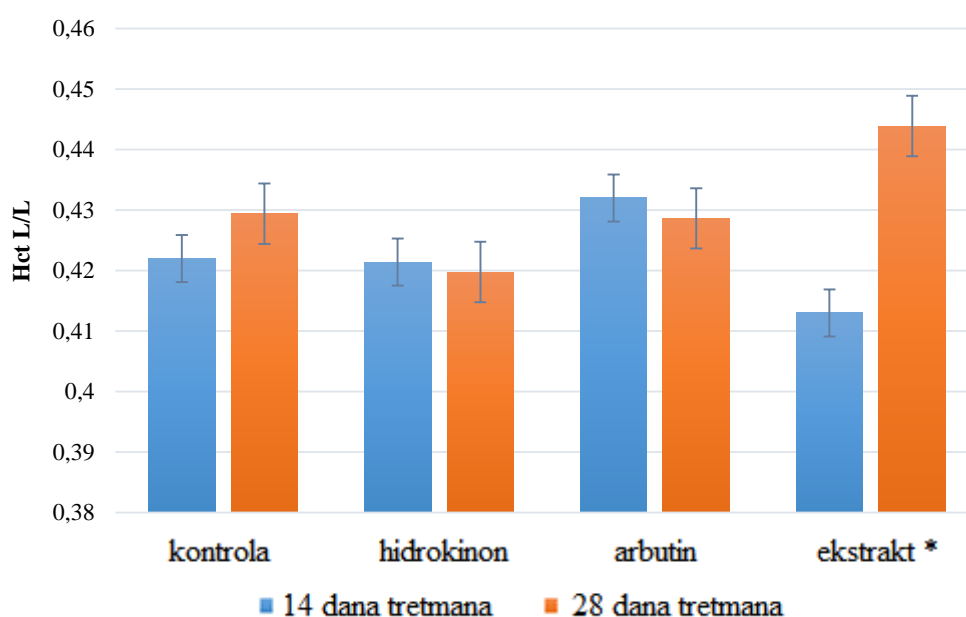
Tablica 4. Vrijednosti (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) trombokrita (PCT), srednjeg volumena trombocita (MPV) i indeksa heterogenosti populacije trombocita (PDW) kod ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg

	Kontrola	Hidrokinon	Arbutin	Ekstrakt*
14 dana				
PCT %	0,0043 \pm 0,0005	0,0043 \pm 0,0005	0,0040 \pm 0,000	0,0040 \pm 0,000
MPV fL	6,2500 \pm 0,1309	6,2000 \pm 0,2000	6,3750 \pm 0,1832	6,0638 \pm 0,1593
PDW %	35,5625 \pm 0,5680	34,7625 \pm 0,7763	35,3625 \pm 0,8501	34,0500 \pm 0,7309
28 dana				
PCT %	0,0038 \pm 0,0005	0,0033 \pm 0,0005	0,0038 \pm 0,0004	0,0038 \pm 0,0005
MPV fL	6,2875 \pm 0,2295	5,9875 \pm 0,0835	6,2000 \pm 0,2828	6,0750 \pm 0,1909
PDW %	35,1125 \pm 0,5939	34,1500 \pm 1,0610	34,6000 \pm 0,7510	34,4500 \pm 0,9914

*ekstrakt lista obične planike

3.1.3. Analiza hematokrita

U mužjaka tretiranih hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana uočen je pad hematokrita, dok je kod skupine tretirane arbutinom tijekom 14 dana planike zabilježen porast hematokrita u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 12). U tretmanu tijekom 28 dana pad hematokrita zabilježen je u skupinama tretiranim arbutinom i hidrokinonom dok je u skupini tretiranoj ekstraktom zabilježen porast hematokrita u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 12). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima, korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije utvrđena.

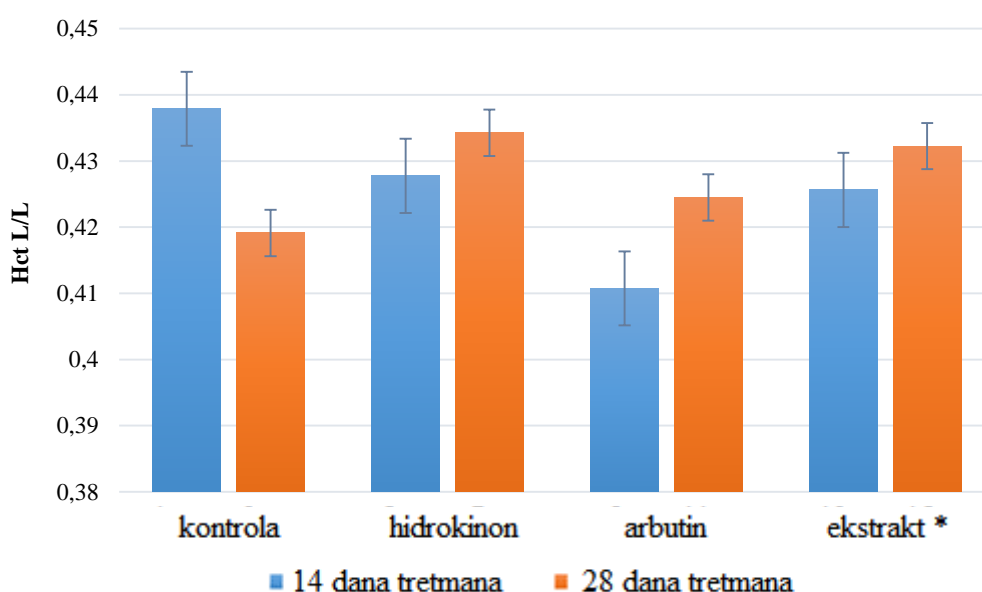


Slika 12. Srednje vrijednosti hematokrita (Hct) i standardne devijacije u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 odnosno 28 dana

*ekstrakt lista obične planike

┐- standardna devijacija

Nakon 14 dana, u ženki tretiranih arbutinom, hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg uočen je pad volumen crvenih krvnih stanica, odnosno hematokrita u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 13). Nasuprot tome, u tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast volumena crvenih krvnih stanica u skupinama tretiranim hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 13). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima, korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije utvrđena.



Slika 13. Srednje vrijednosti hematokrita i standardne devijacije u ženki štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 odnosno 28 dana

*ekstrakt lista obične planike

┐- standardna devijacija

3.1.4. Analiza hemoglobina i izvedenih parametara

U mužjaka, nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, povećanje vrijednosti Hb-a pokazuje grupa tretirana arbutinom, a smanjenje grupe tretirane hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5). Nakon 28 dana povećanje vrijednosti Hb-a pokazuje skupina tretirana ekstraktom lista obične planike, a smanjenje skupine tretirane arbutinom i hidrokinonom u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5).

Nakon 14 dana tretmana arbutinom, hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, u skupinama ženki, uočen je pad Hb-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6). Nasuprot tome, u tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast Hb-a u skupinama tretiranim hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6).

U mužjaka, nakon 14 dana tretmana povećanje vrijednosti MCV-a, u odnosu na kontrolnu skupinu, pokazuju skupine tretirane arbutinom i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg, a smanjenje grupa tretirane ekstraktom lista obične planike u dozi od 200 mg/kg (Tablica 5). Nakon 28 dana povećanje vrijednosti MCV-a, u odnosu na kontrolnu skupinu, pokazuju skupine tretirane ekstraktom lista obične planike i hidrokinonom, a smanjenje skupina tretirane arbutinom (Tablica 5).

U ženki tretiranih arbutinom, hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 dana uočen je porast MCV-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6). Nasuprot tome, u tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast MCV-a u skupinama tretiranim hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine tretirane arbutinom uočen pad (Tablica 6).

Nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, u mužjaka, povećanje vrijednosti MCH-a pokazuju skupine tretirane arbutinom i hidrokinonom, a smanjenje grupa tretirane ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5). Nakon 28 dana povećanje vrijednosti MCH-a u odnosu na kontrolnu skupinu pokazuje skupina tretirana arbutinom, a smanjenje skupine tretirane ekstraktom lista obične planike i hidrokinonom (Tablica 5).

Nakon 14 dana tretmana arbutinom, hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg tijekom u ženki Lewis štakora uočen je porast vrijednosti MCH-a kod skupine tretirane hidrokinonom, a pad vrijednosti kod skupine tretirane arbutinom i ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6). U tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast MCH-a u skupinama tretiranim hidrokinonom i ekstraktom lista obične

planike u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine tretirane arbutinom uočen pad (Tablica 6).

U mužjaka nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, smanjenje vrijednosti MCHC-a, u odnosu na kontrolnu skupinu, pokazuju sve skupine (Tablica 5). Isto tako, nakon 28 dana smanjenje vrijednosti MCHC-a u odnosu na kontrolnu skupinu pokazuju sve skupine (Tablica 5).

Kod svih skupina ženki Lewis štakora nakon 14 dana tretmana arbutinom, hidrokinonom i ekstraktom lista u dozama od 200 mg/kg obične planike uočen je pad vrijednosti MCHC-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6). U tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast MCHC-a u skupini tretiranoj arbutinom dok je kod skupina tretiranih hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu uočen pad vrijednosti (Tablica 6).

T-test i analiza varijance-ANOVA korišteni su kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima Hb, MCV, MCH i MCHC te nije pronađena statistički značajna razlika.

Tablica 5. Rezultati (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) količine hemoglobina (Hb), srednjeg staničnog volumena (MCV), srednje količine hemoglobina u eritrocitu (MCH) i srednje stanične vrijednosti hemoglobina (MCHC) kod mužjaka štakora soja Lewis oralno tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

	kontrola	hidrokinon	arbutin	ekstrakt*
14 dana				
Hb g/L	140,83 \pm 3,43	139,50 \pm 4,50	143,25 \pm 9,88	134,50 \pm 3,07
MCV fL	46,00 \pm 0,89	46,75 \pm 1,67	48,13 \pm 1,36	45,88 \pm 0,83
MCH pg	15,37 \pm 0,27	15,41 \pm 0,28	15,53 \pm 0,20	15,00 \pm 0,24
MCHC g/L	334,00 \pm 7,92	329,25 \pm 7,83	322,63 \pm 8,50	325,88 \pm 3,14
28 dana				
Hb g/L	140,38 \pm 2,67	133,00 \pm 0,89	139,75 \pm 0,24	140,63 \pm 3,48
MCV fL	46,75 \pm 2,14	48,38 \pm 1,06	46,50 \pm 0,28	47,13 \pm 5,85
MCH pg	15,24 \pm 2,38	15,34 \pm 1,07	15,16 \pm 0,12	14,96 \pm 8,00
MCHC g/L	327,13 \pm 3,74	316,75 \pm 0,64	326,63 \pm 0,25	316,88 \pm 5,69

*ekstrakt lista obične planike

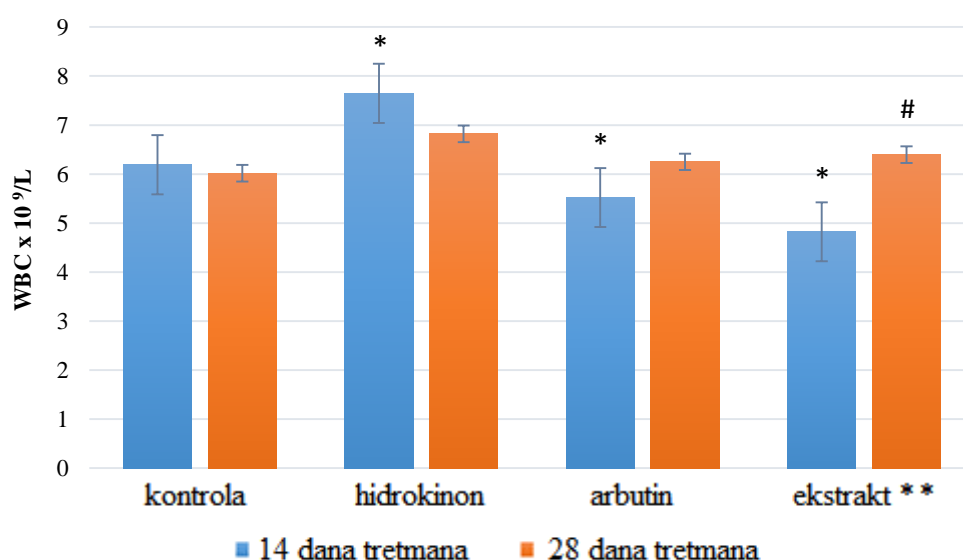
Tablica 6. Rezultati (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) količine hemoglobina (Hb), srednjeg staničnog volumena (MCV), srednje količine hemoglobina u eritrocitu (MCH) i srednje stanične vrijenosti hemoglobina (MCHC) kod mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

	kontrola	hidrokinon	arbutin	ekstrakt*
14 dana				
Hb g/L	141,38 \pm 4,21	135,00 \pm 1,77	131,25 \pm 2,55	132,88 \pm 3,00
MCV fL	50,63 \pm 0,52	52,50 \pm 0,53	50,75 \pm 0,89	51,50 \pm 1,07
MCH pg	16,33 \pm 0,25	16,49 \pm 0,31	16,23 \pm 0,23	16,09 \pm 0,17
MCHC g/L	323,00 \pm 4,50	315,50 \pm 5,90	319,75 \pm 5,04	312 \pm 7,23
28 dana				
Hb g/L	130,13 \pm 3,80	132,00 \pm 2,00	132,33 \pm 1,86	132,13 \pm 1,46
MCV fL	51,88 \pm 0,64	53,75 \pm 0,46	51,17 \pm 0,41	52,88 \pm 0,35
MCH pg	16,10 \pm 0,30	16,35 \pm 0,21	15,93 \pm 0,15	16,20 \pm 0,28
MCHC g/L	310,38 \pm 4,93	304,13 \pm 4,52	311,50 \pm 2,59	305,75 \pm 4,46

*ekstrakt lista obične planike

3.1.5. Analiza broja bijelih krvnih stanica

Korištenjem t-testa utvrdili smo da je broj bijelih krvnih stanica u mužjaka tretiranih arbutinom i ekstraktom lista obične planike, u dozama od 200 mg/kg, tijekom 14 dana statistički značajno smanjen ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu dok grupa tretirana hidrokinonom, u dozi od 200 mg/kg, tijekom 14 dana ima statistički je značajno povećan ($p < 0,05$) broj bijelih krvnih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 14). U tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast broja bijelih krvnih stanica u skupinama tretiranim hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 14). Analizom varijance –ANOVA utvrđeno je i statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) broja bijelih krvnih stanica u skupini tretiranoj tijekom 28 dana ekstraktom lista obične planike u odnosu na tretman tijekom 14 dana.



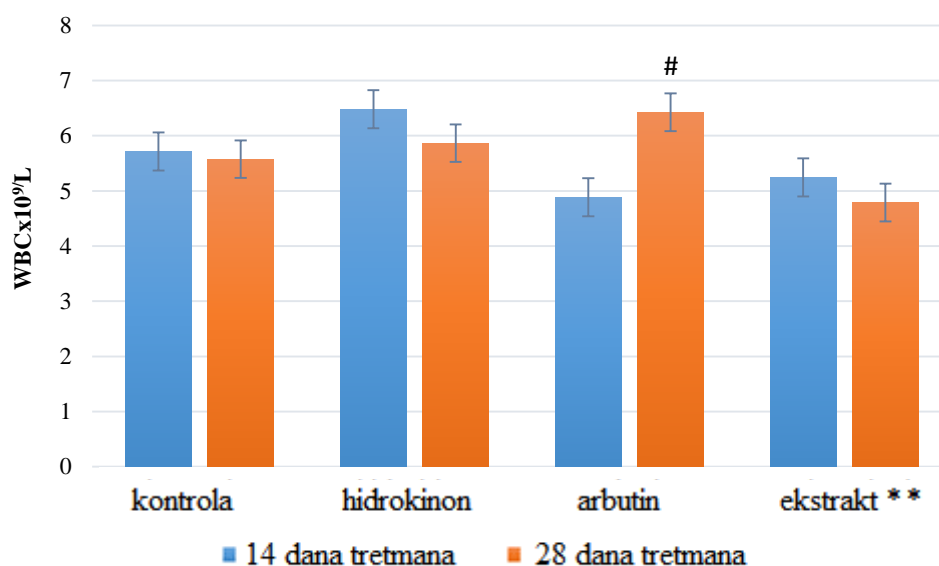
Slika 14. Srednja vrijednosti broja bijelih krvnih stanica i standardna devijacija u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 odnosno 28 dana.

*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu tijekom 14 dana

statistički značajno različito u odnosu na tretman tijekom 14 dana

**ekstrakt lista obične planike

Broj bijelih krvnih stanica u ženki tretiranih hidrokinonom u dozi od 200 mg/kg tijekom 14 dana povećan je u odnosu na kontrolnu skupinu, a grupa tretirana ekstraktom lista obične planike i arbutinom u dozi od 200 mg/kg tijekom 14 dana ima smanjen broj bijelih krvnih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 15). U tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast broja bijelih krvnih stanica u skupina tretiranih hidrokinonom i arbutinom, dok je skupina tretirana ekstraktom lista obične planike zabilježila pad WBC-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 15). Korištenjem analize varijance-ANOVA utvrđeno je statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) broja bijelih krvnih stanica u skupini tretiranoj arbutinom tijekom 28 dana i u odnosu na tretman tijekom 14 dana.



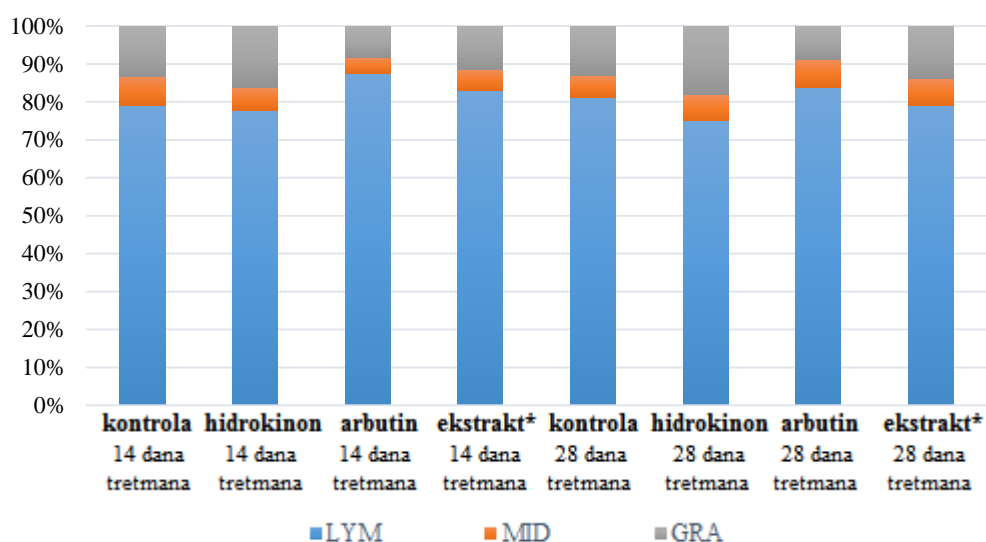
Slika 15. Srednje vrijednosti broja bijelih krvnih stanica i standardne devijacije u ženki štakora soja Lewis tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike* oralno u dozama od 200 mg/kg tijekom 14 odnosno 28 dana.

statistički značajno različito u odnosu na tretman tijekom 14 dana

**ekstrakt lista obične planike

3.1.6. Analiza pojedinih tipova bijelih krvnih stanica

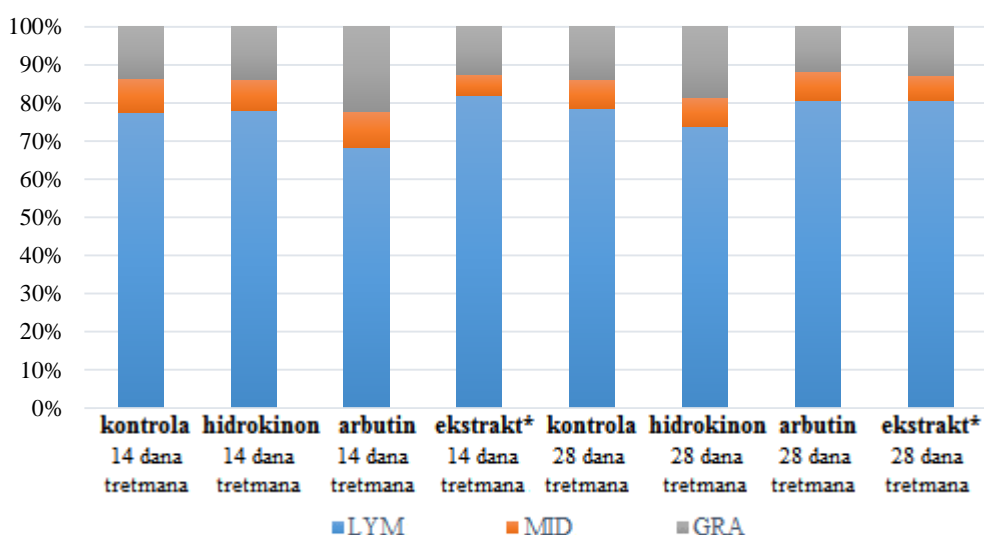
Broj bijelih krvnih stanica u mužjaka tretiranih arbutinom i ekstraktom lista obične planike smanjen je u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 14), a detaljnijom analizom različitih vrsta bijelih krvnih stanica vidimo da je to najviše zbog smanjenog broja granulocita, a da je do povećanja broja bijelih krvnih stanica, kod skupine tretirane hidrokinonom, došlo, opet, zbog povećanja broja granulocita (Slika 16). Isto tako, nakon 28 dana za porast broja bijelih krvnih stanica u skupini tretiranoj hidrokinonom zaslužan je porast broja granulocita (Slika 14), u skupini tretiranoj arbutinom porast broja limfocita, a u skupini tretiranoj ekstraktom lista obične planike za porast broja bijelih krvnih stanica odgovoran je porast broja monocita i eozinofila. Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t- test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.



Slika 16. Udio pojedinih tipova leukocita u perifernoj krvi mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg

*ekstrakt lista obične planike; LYM – limfociti, MID – monociti i eozinofili, GRA – granulociti

Kao što se može vidjeti u grafu koji prikazuje promjenu broja bijelih krvnih stanica u ženki tretiranih hidrokinonom WBC je povećan u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 15), iz ovih rezultat vidljivo je su se sve skupine unutar populacije WBC-a povećale proporcionalno (Slika 17), grupa tretirana arbutinom ima smanjen broj bijelih krvnih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu zbog smanjenog broja limfocita dok grupa tretirana ekstraktom lista obične planike ima smanjen broj bijelih krvnih stanica zbog povećanja broja granulocita (Slika 17). U tretmanu tijekom 28 dana zabilježen je porast broja bijelih krvnih stanica u skupina tretiranih hidrokinonom i arbutinom, kod grupe tretirane hidrokinonom zbog porasta broja granulocita, a kod grupe tretirane arbutinom zbog porasta broja limfocita. Skupina tretirana ekstraktom lista obične planike zabilježila je pad WBC-a u odnosu na kontrolnu skupinu zbog smanjenja broja granulocita (Slika 17). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t- test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.



Slika 17. Udio pojedinih tipova leukocita u perifernoj krvi ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg

*ekstrakt lista obične planike; LYM – limfociti, MID – monociti i eozinofili, GRA – granulociti

3.2. Biokemijski parametri

3.2.1. Analiza enzima aspartat aminotransferaze

U mužjaka enzim aspartat aminotransferaza, nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, smanjen je kod svih grupa u odnosu na kontrolnu skupinu s tim da najveći pad bilježi skupina tretirana ekstraktom lista obične planike (Tablica 7). Nasuprot tome, nakon 28 dana tretmana skupine tretirane hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike imaju povećane vrijednosti AST-a, a skupina tretirana arbutinom smanjen u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 7). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 7. Količina enzima aspartat aminotransferaze (AST) (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg

AST (U/L)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	65,75 \pm 9,21	61,25 \pm 7,93
Hidrokinon	63,75 \pm 6,60	75,00 \pm 30,49
Arbutin	59,75 \pm 6,90	60,25 \pm 15,58
Ekstrakt*	55,25 \pm 3,86	65,00 \pm 4,97

*ekstrakt lista obične planike

Nakon 14 dana tretmana u ženki Lewis štakora tretiranih ekstraktom lista obične planike, arbutinom i hidrokinonom u dozama od 200 mg/kg enzim aspartat aminotransferaza smanjen je kod svih grupa u odnosu na kontrolnu skupinu, baš kao i kod mužjaka (Tablica 8). I kod ženki najveći pad bilježi skupina tretirana ekstraktom lista obične planike. Nasuprot tome, nakon 28 dana tretmana sve grupe imaju povećane vrijednosti AST-a u odnosu na kontrolnu skupinu s time da najveći porast AST-a bilježi skupina tretirana hidrokinonom (Tablica 8). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 8. Količine enzima aspartat aminotransferaze (AST) (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

AST (U/L)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	72,75 \pm 15,71	54,75 \pm 23,34
Hidrokinon	62,75 \pm 12,01	83,50 \pm 2,22
Arbutin	59,75 \pm 5,19	72,00 \pm 15,58
Ekstrakt*	58,33 \pm 8,81	68,25 \pm 24,78

*ekstrakt lista obične planike

3.2.2. Analiza alanin aminotransferaze

U mužjaka nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, enzim alanin aminotransferaza, povećan je kod grupe tretirane ekstraktom lista obične planike, smanjen kod grupe tretirane arbutinom i jednak kontrolnoj skupini u slučaju grupe tretirane hidrokinonom (Tablica 9). Nasuprot tome, nakon 28 dana tretmana sve grupe imaju povećane vrijednosti ALT-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 9). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 9. Količina enzima alanin aminotransferaze (ALT) (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

ALT (U/L)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	38,75 \pm 4,11	36,00 \pm 7,09
Hidrokinon	38,75 \pm 4,72	46,75 \pm 13,15
Arbutin	35,25 \pm 3,60	39,25 \pm 5,80
Ekstrakt*	39,25 \pm 4,65	40,50 \pm 3,11

*ekstrakt lista obične planike

Enzim alanin aminotransferaza nakon 14 dana tretmana, u ženki Lewis štakora, povećan je kod grupe tretirane ekstraktom lista obične planike u dozi od 200 mg/kg, a smanjen kod grupa tretiranih arbutinom i hidrokinonom, u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 10). Nasuprot tome, nakon 28 dan tretmana sve grupe imaju povećane vrijednosti ALT-a u odnosu na kontrolnu skupinu s tim da najveći porast bilježi skupina tretirana hidrokinonom (Tablica 10). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 10. Rezultati količine enzima alanin aminotransferaze (ALT) (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

ALT (U/L)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	39,25 \pm 10,37	33,75 \pm 3,40
Hidrokinon	36,75 \pm 9,03	54,25 \pm 4,11
Arbutin	37,25 \pm 7,04	42,50 \pm 5,80
Ekstrakt*	41,50 \pm 4,08	37,00 \pm 10,68

*ekstrakt lista obične planike

3.2.3. Analiza laktat dehidrogenaze

Nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, u mužjaka, enzim laktat dehidrogenaza, smanjen je kod svih grupa u odnosu na kontrolnu skupinu i to najviše kod skupine tretirane ekstraktom lista obične planike (Tablica 11). Nakon 28 dana tretmana, grupe tretirane hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike imaju povećane vrijednosti LDH-a u odnosu na kontrolnu skupinu, a grupa tretirana arbutinom smanjenu vrijednost LDH-a (Tablica 11). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 11. Količina enzima laktat dehidrogenaze (LDH) i (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

LDH (U/L)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	380,00 \pm 175,20	237,00 \pm 41,63
Hidrokinon	288,25 \pm 206,15	387,50 \pm 104,73
Arbutin	250,25 \pm 46,63	108,25 \pm 138,64
Ekstrakt*	142,00 \pm 82,04	349,50 \pm 96,57

*ekstrakt lista obične planike

U ženki Lewis štakora enzim laktat dehidrogenaza nakon 14 dana tretmana smanjen je kod grupa tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozi od 200 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 12). Nasuprot tome, nakon 28 dana tretmana grupe tretirane hidrokinonom i arbutinom imaju povećane vrijednosti LDH-a, a grupa tretirana ekstraktom lista obične planike smanjenu vrijednost LDH-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 12). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 12. Rezultati količine enzima laktat dehidrogenaze (LDH) i (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

LDH (U/L)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	143,00 \pm 83,35	138,00 \pm 111,85
Hidrokinon	116,25 \pm 38,19	206,00 \pm 66,62
Arbutin	108,75 \pm 24,01	230,75 \pm 138,65
Ekstrakt*	106,00 \pm 105,82	153,25 \pm 26,71

*ekstrakt lista obične planike

3.2.4. Analiza kreatinina

Nakon 14 dana tretmana, u mužjaka, vrijednost kreatinina smanjena je kod grupe tretirane, u dozi od 200 mg/kg, ekstraktom lista obične planike, jednaka kod grupe tretirane hidrokinonom u dozi od 200 mg/kg, a povećana kod grupe tretirane arbutinom u dozi od 200 mg/kg u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 13). Nakon 28 dana tretmana, sve grupe imaju povećanu vrijednost kreatinina u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 13). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 13. Količine kreatinina (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

Kreatinin $\mu\text{mol/L}$		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	18,00 \pm 2,83	17,00 \pm 1,91
Hidrokinon	18,00 \pm 3,37	20,50 \pm 4,99
Arbutin	22,00 \pm 0,82	19,25 \pm 3,65
Ekstrakt*	17,50 \pm 3,32	17,50 \pm 2,38

*ekstrakt lista obične planike

U ženki vrijednost kreatinina, nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, smanjena je kod grupe tretirane ekstraktom lista obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu, jednaka kod grupe tretirane hidrokinonom, a povećana kod grupe tretirane arbutinom, kao što je to bio slučaj i kod mužjaka (Tablica 14). Nakon 28 dana, grupe tretirane ekstraktom lista obične planike i hidrokinonom imaju povećanu vrijednost kreatinina u odnosu na kontrolnu skupinu, a grupa tretirana arbutinom smanjenu (Tablica 14). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 14. Rezultati količine kreatinina (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike oralno u dozama od 200 mg/kg

Kreatinin $\mu\text{mol/L}$		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	18,50 \pm 4,20	21,50 \pm 4,93
Hidrokinon	18,50 \pm 3,30	23,75 \pm 3,40
Arbutin	20,75 \pm 1,89	19,00 \pm 3,65
Ekstrakt*	17,75 \pm 2,16	23,50 \pm 1,91

*ekstrakt lista obične planike

3.2.5. Analiza glukoze

Vrijednosti glukoze u krvi mužjaka Lewis štakora, nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, smanjene su u grupi tretiranoj arbutinom, a povećane su, u odnosu na kontrolnu skupinu, kod grupa tretiranih hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike (Tablica 15). Nakon 28 dana tretmana, glukoza je smanjena kod grupe tretirane hidrokinonom, a povećana kod skupina tretiranih arbutinom i ekstraktom lista obične planike, u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 15). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 15. Količina glukoze (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

Glukoza (mg/dL)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	19,33 \pm 2,01	18,80 \pm 1,06
Hidrokinon	22,33 \pm 1,72	17,90 \pm 1,28
Arbutin	18,85 \pm 4,67	19,60 \pm 1,14
Ekstrakt*	20,43 \pm 2,28	20,30 \pm 0,82

*ekstrakt lista obične planike

Nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, u ženki je vrijednost glukoze smanjena kod grupa tretiranih ekstraktom lista obične planike i arbutinom, a povećana je kod skupine tretirane hidrokinonom u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 16). Nakon 28 dana, grupe tretirane hidrokinonom i arbutinom imaju smanjenu glukozu u odnosu na kontrolnu skupinu, a grupa tretirana ekstraktom lista obične planike povećanu (Tablica 16). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 16. Količina glukoze (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u krvi ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

Glukoza (mg/dL)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	17,03 \pm 4,42	15,58 \pm 2,32
Hidrokinon	17,30 \pm 1,73	15,18 \pm 0,80
Arbutin	16,40 \pm 2,21	14,23 \pm 1,14
Ekstrakt*	16,23 \pm 4,47	16,08 \pm 0,43

*ekstrakt lista obične planike

3.2.6. Analiza uree

Rezultati mjerenja uree u serumu štakora nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, pokazuju smanjenje samo kod skupine tretirane ekstraktom lista obične planike, a povećanje vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu kod skupina tretiranih hidrokinonom i arbutinom (Tablica 17). Nakon 28 dana tretmana, sve skupine imaju smanjene vrijednosti uree u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 17). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 17. Količine uree (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

Urea mmol/L		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	5,83 \pm 0,55	5,28 \pm 0,31
Hidrokinon	6,63 \pm 0,29	5,18 \pm 0,64
Arbutin	6,00 \pm 0,22	5,23 \pm 0,41
Ekstrakt*	5,43 \pm 0,60	5,25 \pm 0,47

*ekstrakt lista obične planike

U ženki, vrijednost uree, nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, smanjena je samo kod skupine tretirane ekstraktom lista obične planike, a povećana, u odnosu na kontrolnu skupinu, kod skupina tretiranih hidrokinonom i arbutinom baš kao i kod mužjaka (Tablica 18). Nakon 28 dana, grupe tretirane hidrokinonom i ekstraktom lista obične planike imaju smanjenu količinu uree u odnosu na kontrolnu skupinu, a grupa tretirana arbutinom povećanu (Tablica 18). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 18. količine uree (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

Urea mmol/L		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	5,15 \pm 0,65	4,88 \pm 0,39
Hidrokinon	5,33 \pm 0,33	4,65 \pm 0,74
Arbutin	5,60 \pm 0,76	5,65 \pm 0,41
Ekstrakt*	4,73 \pm 0,67	4,73 \pm 0,24

*ekstrakt lista obične planike

3.2.7. Analiza ukupnih proteina

Mjerenja ukupnih proteina pokazuju nam da su proteini kod većine grupa povišeni. U mužjaka ukupni proteini, nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, povećani su u odnosu na kontrolnu skupinu kod grupe tretirane hidrokinonom, a smanjeni kod grupa tretiranih arbutinom i ekstraktom lista obične planike (Tablica 19). Nakon 28 dana tretmana, sve grupe imaju povećanu vrijednost ukupnih proteina u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 19). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 19. Količina ukupnih proteina (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u krvi mužjaka štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

Ukupni proteini (g/dL)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	56,25 \pm 0,50	54,75 \pm 2,99
Hidrokinon	56,50 \pm 2,08	55,75 \pm 2,16
Arbutin	54,50 \pm 1,29	57,00 \pm 1,41
Ekstrakt*	55,25 \pm 2,06	56,50 \pm 1,91

*ekstrakt lista obične planike

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u ženki Lewis štakora, nakon 14 dana tretmana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg, pokazuju povećanje vrijednosti u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 20). Skupina koja je tretirana ekstraktom lista obične planike pokazuje najveći porast ukupnih proteina (Tablica 20). Nakon 28 dan tretmana grupe tretirane hidrokinonom i arbutinom imaju smanjenu vrijednost ukupnih proteina u odnosu na kontrolnu skupinu, a skupina tretirana ekstraktom lista obične planike povećanu (Tablica 20). Kako bi se testirale uočene razlike u rezultatima korišteni su t-test i analiza varijance-ANOVA, ali statistički značajna razlika nije pronađena.

Tablica 20. Količina ukupnih proteina (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) u ženki štakora soja Lewis tretiranih 14 odnosno 28 dana hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike u dozama od 200 mg/kg

Ukupni proteini (g/dL)		
	14 dana tretmana	28 dana tretmana
Kontrola	59,50 \pm 4,65	62,25 \pm 2,75
Hidrokinon	61,50 \pm 2,52	59,00 \pm 3,37
Arbutin	63,50 \pm 3,11	58,00 \pm 1,41
Ekstrakt*	67,00 \pm 3,50	63,75 \pm 3,30

*ekstrakt lista obične planike

4. RASPRAVA

Pripravci obične planike upotrebljavaju se u narodnoj medicini i kuhinji mediteranskog podneblja već dugi niz godina zbog protuupalnog, antibakterijskog i antioksidativnog učinaka (1, 10). Fenolni glikozid arbutin, kojeg prirodno nalazimo u kemijskom sastavu obične planike, skupa sa svojim farmakološki aktivnim metabolitom hidrokinonom, odgovoran je za blagotvorno djelovanje obične planike na ljudsko zdravlje (17, 18). Pa ipak, iako ekstrakt lista obične planike, arbutin i hidrokinon imaju pozitivnih učinaka, ne smije se zanemariti činjenica da postoje dokazi i o toksičnosti i genotoksičnosti hidrokinona, te je potrebno istražiti u kojim koncentracijama obična planika i njezini sastojci postaju opasni za zdravlje (24, 25).

Budući da još nije jasno u kojoj dozi ekstrakt lista obične planike, arbutin i njegov metabolit hidrokinon počinju negativno djelovati na organizam proveli smo ovo istraživanje o njihovom učinku na hematološke i biokemijske parametre krvi u Lewis štakora. Istraživanja na životinjama dosad su pokazala da u većini životinjskih vrsta hidrokinon pokazuje nisku akutnu toksičnost pri oralnom i kožnom izlaganju. Akutna oralna LD₅₀ vrijednost za hidrokinon kreće se od 70 mg/kg kod mačaka pa do 550 mg/kg kod zamoraca. Učinci izlaganja akutnim visokim dozama hidrokinona kod životinja primarno se očituju na središnjem živčanom sustavu (37). Utjecaj hidrokinona na CNS prvi je pokazao Brieger već 1879. godine (37). Znaci koji se javljaju kod oštećenja CNS-a su tremori, slinjenje, hiperekscitabilnost, manjak koordinacije, poteškoće s disanjem, koma i smrt. Kod izlaganja štakora subletalnim dozama kao što su 20, 64 ili 200 mg/kg (5 dana u tjednu, 13 tjedana) zabilježeni su samo prolazni tremori i smanjena motorička aktivnost. Neuropatološke promjene nisu zabilježene kao rezultat ovih doza (37). U našem preliminarnom pokusu koncentracija od 400 mg/kg hidrokinona dnevno pokazala je toksično djelovanje na središnji živčani sustav štakora pa je korištena polovica doze (200 mg/kg), koja izaziva akutnu oralnu toksičnost kod štakora, tijekom 14 odnosno 28 dana pokusa.

Kako bi se utvrdile promjene u organizmu koje uzrokuju ekstrakt lista obične planike, arbutin i hidrokinon korišteni su hematološki i biokemijski parametri. Navedeni spojevi svojom povećanom koncentracijom u organizmu mogu uzrokovati povećani oksidativni stres te mogu utjecati na brojnost i oblik krvnih stanica i tako utjecati, na primjer, na oksigeniranost tkiva i stanje imunološkog sustava (28, 30).

Ekstrakt lista obične planike, arbutin i hidrokinon mogu biti toksični za stanice različitih tkiva te mogu u krvi životinja promijeniti koncentracije određenih biomolekula. Za detekciju tih promjena koriste se biokemijske analize krvi. Tako, na primjer, svaka promjena u

vrijednostima kreatinina u krvi govori o problemu u radu bubrega. Porast vrijednosti kreatinina indicirala bi da je došlo do oštećenja stanica bubrega zbog tretmana određenim agensom (20).

Vrijednosti broja eritrocita kao i broj trombocita i hematokrit kod mužjaka i ženki tretiranih 14 odnosno 28 dana ne pokazuju nikakve pravilnosti, a promjene koje se mogu uočiti nisu statistički značajne. Isti je slučaj i kod rezultata mjerenja hemoglobina i parametara izvedenih iz njega. Razlike između skupina tretiranih hidrokinonom, arbutinom i ekstraktom lista obične planike, koje se mogu uočiti u rezultatima, ne nose nikakvu statističku značajnost te bi se moglo tvrditi nisu uzrokovali bitne promjene. Iako se u istraživanju toksičnosti obične planike rijetko prati broj crvenih krvnih stanica, i pratećih parametara, prema dostupnim podacima rezultati našeg istraživanja podudaraju se sa zaključcima drugih istraživanja (40, 41). Na eritrocitima je dosad zabilježeno da arbutin i hidrokinon nisu odgovorni za povećanu podložnost eritrocita oksidativnom stresu te da ne dovode do hemolize, odnosno smanjenja broja crvenih krvnih stanica (40, 41).

U analizi bijelih krvnih stanica pojavljuju se statistički bitne promjene. Populacija bijelih krvnih stanica i kod mužjaka i kod ženki povećala se pod djelovanjem hidrokinona. Budući da je u istraživanju Pečivova i suradnika arbutin u kombinaciji s drugim spojevima pokazivao smanjivanje toksičnih supstanci u krvi, a time i pozitivno djelovanje na populaciju limfocita, moguće je da je upravo do takvog efekta došlo i u našem pokusu (42). Međutim Andreoli i suradnici utvrdili su da hidrokinon, u koncentracijama manjim od onih korištenih u našem istraživanju, pokazuje genotoksičan učinak što bi upućivalo na to da očekujemo smanjenje u broju bijelih krvnih stanica (43).

Također, iako dolaze iz iste skupine enzima, aspartat i alanin aminotransferaza ponašali su se suprotno. AST je smanjen i kod mužjaka i ženki nakon 14 dana tretmana, a nakon punih 28 dana tretmana jedino skupina mužjaka tretirana arbutinom ima smanjenu vrijednost ovog enzima. ALT te trendove nije pratio te je u većini slučajeva povećan. Značajno povećanje aktivnosti ovih enzima inače je marker poremećaja rada hepatocita, pogotovo povećanje ALT-a (31). Ipak, promjene koje su se dogodile u ovim skupinama, iako zanimljive, nemaju statističku značajnost.

Nadalje, enzim laktat dehidrogenaza pokazuje podudarnosti između muških i ženskih skupina, ali ne i unutar pojedinog spola u usporedbi 14 i 28 dana. Mertens i suradnici utvrdili su da je laktat dehidrogenaza smanjen nakon tretmana hidrokinonom u kombinaciji s bromom. Stoga, iako nisu pokazali statistički značajno smanjenje naši su rezultati na tragu dosadašnjih saznanja (42).

Zanimljivo je spomenuti da između ukupnih proteina i uree, kao krajnjeg produkta metabolizma proteina, ne postoji statistička podudarnost niti je vidljiva ovisnot. Među vrijednostima koje su izmjerene, unutar grupa nije vidljiva povezanost niti postoji statističa važnost pa se može tvrditi da hidrokinon, arbutin i ekstrakt lista obične planike nemaju bitan utjecaj na stanje organizma životinja koje je mjerljivo ovim parametrima. Dosadašnja istraživanja toksičnosti arbutina i hidrokinona nisu se posvećivala mjerenju ovih parametara pa je teško vršiti usporedbe.

Prema rezultatima rada Carvalho Lemos ekstrakt lista obične planike ima tendenciju snižavanja razine glukoze i kreatinina u krvi Wistar štakora u dozama od 1.25 g/kg tjelesne mase po danu (43). Suprotno tome u našim rezultatima nije vidljiva pravilnost promjenama razina glukoze dok je kreatinin uglavnom povišen.

U konačnici, možemo zaključiti da u primijenjenim dozama ispitivane tvari nisu pokazale štetne učinke na štakorima soja Lewis, iako su rezultati pokazali da je došlo do promjena u vrijednostima hematoloških i biokemijskih parametara krvi.

5. ZAKLJUČAK

- u primijenjenim dozama (200 mg/kg) ispitivane tvari nisu pokazale štetne učinke na štakorima soja Lewis
- u mužjaka i ženki nakon 14 dana tretmana ekstraktom lista obične planike smanjene su vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara krvi
- u mužjaka i ženki nakon 28 dana tretmana ekstraktom lista obične planike povećane su vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara krvi
- u ženki nakon 14 dana tretmana arbutinom smanjene su vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara krvi, a nakon 28 dana tretmana arbutinom su povećane
- hidrokinon pokazuje statistički značajno povećanje broja bijelih krvnih stanica, u odnosu na kontrolnu skupinu, nakon 14 dana tretmana stanica kod mužjaka Lewis štakora.
- arbutin i ekstrakt lista obične planike primjenjivani tijekom 14 dana pokazali su statistički značajno ($p < 0,05$, t-test) smanjenje broja bijelih krvnih stanica, u odnosu na kontrolnu skupinu
- ekstrakt lista obične planike pokazuje statistički značajno ($p < 0,05$, Scheffe test) povećanje broja bijelih krvnih stanica nakon 28 dana tretmana u odnosu na tretman 14 dana
- arbutin pokazuje statistički značajno povećanje ($p < 0,05$, Scheffe test) broja bijelih krvnih stanica nakon 28 dana tretmana u odnosu na tretman 14 dana kod ženki Lewis štakora

Literatura

1. Hülya Orak H, Yağar H, Selen Isbilir S, Şükrü Demirci A, Gümüş T, Ekinci N (2011): Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). Food Science and Biotechnology. 20 (5): 1249-1256
2. Maleš Ž, Plazibat M, Bilušić Vundaš V, Žuntar I (2006): Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). Acta Pharmaceutica. 56: 245–250
3. Blaut M, Braune A, Wunderlich S, Sauer P, Schneider H, Glatt H (2006): Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology. 44: 1940–1947
4. Malheiroa R, Saa O, Pereira E, Aguiar C, Baptista P, Pereira J A (2012): *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. Industrial Crops and Products. 37 (1): 473–478
5. web izvor: <https://blogs.ubc.ca/juxuewei/list-7/>
6. Vidrih R, Hribar J, Prgomet Ž, Poklar Ulrih N (2013): The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. Croatian Journal of Food Science and Technology. 5 (1): 29-33
7. Oliveira I, Baptista P, Malheiro R, Casal S, Bento A, Pereira J A (2011): Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. Food Research International. 44 (5): 1401–1407
8. Dib M A, Paolini J, Bendahou M, Varesi L, Allali H, Desjobert J M, Boufeldja T, Costa J (2010): Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves stems and roots of *Arbutus unedo* and in vitro antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. Natural Product Communications 5: 1085–1090
9. Gaspar E M S M, das Neves H J C, Noronha J P (1997): Application of HPLC-PBMS to the identification of unknown components in a triterpenoid fraction of *Arbutus unedo* fruits. Journal of High Resolution Chromatography. 20: 417–420.
10. Kivçak B, Mert T, Ertabaklar H, Balcioğlu IC, Ozensoy Töz S (2009): In vitro activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. Turkish Journal of Parasitology. 33: 114–115
11. Bravo L (1998): Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews. 56 (11): 317- 333

12. Rong T. (2010): Chemistry and Biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2 (12): 1231-1246
13. Kumar S, Pandey A K (2013): Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*. 2013: 162750
14. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N (2011): Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (31): 6697-6703
15. Kohen R, Nyska A (2002): Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30 (6): 620-650
16. Guyton A C, Hall J E (2015): *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 13. izdanje. Elsevier Health Sciences.
17. Lukas B, Schmiderer C, Mitteregger U, Novak J (2010): Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chemistry*. 121: 185–190
18. Schindler G, Patzak U, Brinkhaus B, Von Nieciecki A, Wittig J, Kräbmer N, Glöckl I, Veit M (2002): Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uva-ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 42: 920-927
19. Yarnell E (2002): Botanical medicines for the urinary tract. *World Journal of Urology*. 20: 285–293
20. Rennke H G, Denker B M (2007): *Renal pathophysiology: The essentials*. 2. izdanje. Lippincott Williams & Wilkins. str: 24-27
21. Jeong Kang M, Woo Ha H, Hwan Kim G, Kyu Lee S, Tae Ahn Y, Hyun Kim D, Hye Gwang Jeong H, Cheon Jeong T (2012): Role of metabolism by intestinal bacteria in arbutin-induced suppression of lymphoproliferative response in vitro. *Biomolecules and Therapeutics*. 20 (2): 196–200
22. Peters M M C G, Jones T W, Monks, T J, Lau, S S (1997): Cytotoxicity and cell proliferation induced by the nephrocarcinogen hydroquinone and its nephrotoxic metabolite 2,3,5-(tris-glutathion-S-yl)hydroquinone. *Carcinogenesis*. 18: 2393–2401
23. Shibata M A, Hirose M, Tanaka H, Asakawa E, Shirai T, Ito N (1991): Induction of renal cell tumors in rats and mice, and enhancement of hepatocellular tumor development in mice after long term hydroquinone treatment. *Japanese Journal of Cancer Research*. 82: 1211–1219

24. EPA Air Toxics (2000): EPA Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants. CAS 123-31-9
25. Palumbo A, d'Ischia M, Misuraca G, Prota G (1991): Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 173 (1): 85-90
26. Kolbe L, Mann T, Gerwat W, Batzer J, Ahlheit S, Scherner C, Wenck H, Stäb F (2013): 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 1: 19-23
27. Ji Z, Zhang L, Guo W, McHale C M, Smith M T (2009): The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis*. 24 (4): 367–372
28. Susan Cotter S M (2001): Hematology. Teton NewMedia, Wyoming
29. Greer J P (2009) – Wintorbe's clinical hematology. 12. izdanje. Lippincott Williams & Wilkins.
30. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002): Molecular Biology of the Cell. 4. izdanje. Garland Science.
31. Marshall W J, Lapsley M, Day A, Ayling R (2014): Clinical biochemistry: Metabolic and clinical aspects. Elsevier Health Sciences. 3. izdanje 2014
32. Hames B D, Hooper N M (2005): Biochemistry. 3. izdanje. Garland Science. str. 84 -87
33. Leszek Szablewski (2011): Glucose homeostasis and insulin resistance. Bentham Science Publishers. 2011: 176-178
34. Russell N J, Powell N G, Jones J G, Winterburn P J, Basford J M (2013): Blood biochemistry. Springer Science & Business Media. str. 153
35. Jurica K (2016): Fenolne tvari iz obične planike (*Arbutus unedo* L.) i njihovi biološki učinci. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu
36. Garcia de Arriba S, Naser B, Nolte K U (2013): Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos Uva-ursi folium* herbal preparations. *International Journal of Toxicology* 32: 442-456
37. DeCaprio A P (1999): The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. *Critical Reviews in Toxicology*. 29 (3): 283–330

38. Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M (2011): Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 2285–2291
39. Sarkar C, Prasanta K M, Shyamaprasad S, Chittaranjan N, Ranadhir C (2009): Effect of copper-hydroquinone complex on oxidative stress-related parameters in human erythrocytes (in vitro). *Toxicology Mechanisms and Methods*. 19: 86–93
40. Pečivova J, Nosal R, Svitekova K, Mačičkova T (2014): Arbutin and decrease of potentially toxic substances generated in human blood neutrophils. *Interdisciplinary Toxicology*. 7(4): 195–200
41. Andreoli C, Rossi S, Leopardi P, Crebelli R (1999): DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: Analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutation Research*. 438: 37–45
42. Mertens J J, Gibson N W, Lau S S, Monks T J (1995): Reactive oxygen species and DNA damage in 2-bromo-(glutathion-S-yl) hydroquinone-mediated cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 320 (1): 51-58
43. Carvalho L V (2015): Evaluation of the effect of *Arbutus unedo* L. extracts on blood indices and microelements status in high-fat STZ-induced diabetic rats. *Magistarska disertacija*. Universidade de Aveiro

Životopis

Obrazovanje

2014.-2016. Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski studij eksperimentalne biologije

Modul: Fiziologija i imunobiologija

2014. L'Université Paris Descartes

CRI – Centre de Recherches Interdisciplinaires, Pariz (Francuska)

Frontières du Vivant

Internacionalni semestar

2010.-2014. Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet

Biološki odsjek

Preddiplomski studij znanosti o okolišu

2007.-2010. XI. Gimnazija u Zagrebu

Iskustvo u struci

Laboratorijske vježbe:

Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice (odjel za onkologiju)

CRI - Centre de Recherches Interdisciplinaires, Pariz (Francuska)

Laboratorijska praksa:

Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (jedinica za mutagenezu)

Unité de Neurosciences, Information et Complexité - Centre national de la recherche scientifique (Francuski nacionalni centar za znanstvena istraživanja)

Studentski poslovi

Zagrebački Velesajam, Zagreb

Botanički vrt PMF-a, Zagreb

Geološki odsjek PMF-a, demonstrator, Zagreb

Volonterski rad

Noć biologije, PMF, Zagreb

Ljetna tvornica znanosti, MedILS, Split

Park prirode Telašćica, Dugi otok

Osobne i komunikacijske vještine

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici: engleski, njemački

Dobro razvijena intrapersonalna komunikacija kao rezultat preispitivanja vlastitih odluka i svakodnevnih pojava, kao i interpersonalna komunikacija razvijena raznim diskusijama s kolegama, u izvedbama edukativnih radionica za djecu i tijekom vođenja turističkih tura u Botaničkom vrtu

Digitalna kompetencija

Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi - Internet(e-mail, google+, društvene mreže), uporaba programskog jezika Python